

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ajda PREVC

**VPLIV IZBRANIH NANOMATERIALOV NA
TVORBO LAMELARNIH TELESC V CELICAH *IN*
*VITRO***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študijski program – 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ajda PREVC

**VPLIV IZBRANIH NANOMATERIALOV NA TVORBO
LAMELARNIH TELESC V CELICAH *IN VITRO***

Magistrsko delo
Magistrski študijski program – 2. stopnja

**THE INFLUENCE OF NANOMATERIALS ON FORMATION OF
LAMELLAR BODIES IN CELL LINES *IN VITRO***

M. Sc. Thesis
Master Study Programme

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, na Katedri za biokemijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in v laboratoriju za klinično biofiziko Ortopedske klinike v Ljubljani.

Študijska komisija je dne 21. 2. 2014 sprejela temo in za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne in za recenzenta prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Primož ZIDAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Član: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ajda Prevc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 591:577(043.2)=163.6
KG	nanomaterilali/SiO ₂ /CuO/lamelarna telesca/fosfolipidoza/celična linija A549/fluorescentno barvanje/pretočna citometrija/fluorescenčna mikroskopija
AV	PREVC, Ajda, dipl. graf. kom.
SA	DROBNE, Damjana (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI	2014
IN	Vpliv izbranih nanomaterialov na tvorbo lamelarnih telesc v celicah <i>in vitro</i>
TD	Magistrsko delo (magistrski študij – 2. stopnja)
OP	IX, 43 str., 3 pregl., 15 sl., 4 pril., 61 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Vplivi nanodelcev na celice so različni in še ne popolnoma raziskani. Med najmanj raziskanimi so vplivi na metabolizem lipidov v celicah. Med take vplive uvrščamo tudi sprožitev povečane tvorbe lamelarnih telesc. Lamelarna telesca so skupki fosfolipidov, ki so običajno namenjeni znotrajceličnemu shranjevanju lipidov. Povečano število lamelarnih telesc v celicah je morfološki znak fosfolipidoze. Fosfolipidoza je stanje, pri katerem pride do zmanjšane stopnje razgrajevanja fosfolipidov v lizosomih ter do njihovega kopičenja v lamelarnih telescih. Ta motnja običajno nastane ob vnosu amfifilnih, pozitivno nabitih snovi v celico. Novejše raziskave so pokazale, da pride do povečane tvorbe lamelarnih telesc tudi ob stiku celice z nekaterimi nanomateriali. V nalogi smo želeli prilagoditi metodo za vrednotenje količine lamelarnih telesc v celicah A549 s pomočjo fluorescentnih barvil. Testirali smo vpliv nanomaterialov SiO ₂ (nano-SiO ₂) in CuO (nano-CuO) na sprožitev povečane tvorbe lamelarnih telesc v človeških pljučnih celicah A549 ter njihov vpliv na metabolizem teh celic. Uporabili smo naslednje metode: gojenje človeških pljučnih celic A549, fluorescenčno barvanje s fluorescentnim barvilom, vezanim na fosfolipide, pretočno citometrijo, fluorescenčno spektrofotometrijo, fluorescenčno mikroskopijo in metode za testiranje citotoksičnosti. Ugotovili smo, da s fluorescentnm barvilom obarvane celice, tretirane z nano-CuO in nano-SiO ₂ , v primerjavi s kontrolnimi celicami bolj fluorescirajo. Pri pregledu celic, tretiranih z nano-SiO ₂ , pa smo z epifluorescenčnim mikroskopom opazili, da ti nanodelci tudi sami fluorescirajo, verjetno zato, ker se nanje veže uporabljeno fluorescentno barvilo. Iz teh ugotovitev sklepamo, da nano-CuO povečajo količino fosfolipidov (morda lamelarnih telesc) v celicah A549, ki je odvisna od koncentracije nano-CuO, ki so ji izpostavljene celice. Nano-SiO ₂ pa motijo meritve, zato njihovega vpliva pri povečani vsebnosti fosfolipidov v celicah ne moremo ovrednotiti. Ker se uporabljeno barvilo veže na različne fosfolipide, ne moremo z gotovostjo trditi, da so povečane intenzivnosti fluorescence res znak povečane količine lamelarnih telesc. Za potrditev rezultatov bi bilo potrebno preparate pregledati še s transmisijskim elektronskim mikroskopom.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Du2
 DC UDK 591:577(043.2)=163.6
 CX nanomaterials/SiO₂/CuO/lamellar bodies/phospholipidosis/cell line A549/fluorescent staining/flow cytometry/fluorescent microscopy
 AU PREVC, Ajda, dipl. graf. kom.
 AA DROBNE, Damjana (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty
 PY 2014
 TI The influence of nanomaterials on formation of lamellar bodies in cell lines *in vitro*
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)
 NO IX, 43 p., 3 tab., 15 fig., 4 ann., 61 ref.
 LA SI
 AL sl/en
 AB The effects of different nanomaterials on cells vary and are not completely understood. Among the least investigated are the effects on lipid metabolism in cells. Among these effects the formation of lamellar bodies is included. Lamellar bodies are phospholipid aggregates, which usually serve as the storage of phospholipids. An increased amount of lamellar bodies in cells is a hallmark of phospholipidosis. Phospholipidosis is a condition in which the degradation of phospholipids in lysosomes is reduced and phospholipids are stored in the form of lamellar bodies. This disorder can occur if amphiphilic, positively charged substances are introduced to the cell. Recent studies have shown that some nanomaterials can also induce increased lamellar body formation. The goal of our study was to adjust the method for determination of the presence of lamellar bodies in cells by using fluorescent dyes. We tested the influence of SiO₂ and CuO nanomaterials (nano-SiO₂ and nano-CuO, respectively) on the increase in lamellar body formation and their effect on metabolism in human pneumocytes A549. We used the following methods: cultivation of human pneumocytes A549, fluorescent staining using a fluorescent dye conjugated to phospholipids, flow cytometry, fluorescent spectrophotometry, fluorescent microscopy and methods for testing cytotoxicity. We discovered that cells treated with nano-CuO and nano-SiO₂ emit more fluorescence as compared to the non-treated cells. However, by inspection of cells under fluorescent microscope, we noticed that nano-SiO₂ also emitted fluorescent light, since the used fluorescent dye probably binds to these nanoparticles. We have concluded that nano-CuO cause an increase in intracellular phospholipid levels (which may be lamellar bodies) and that this increase is proportional to nano-CuO concentration. Nano-SiO₂ interfere with measurements, so their influence on the increase in intracellular phospholipid levels cannot be evaluated. Because the dye we used in the study binds to various phospholipids, we cannot claim with certainty that the increase in fluorescence really is a sign of increased lamellar body formation. To confirm the results the cells should be examined using the transmission electron microscope.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
SLOVARČEK	IX
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	1
1.2 NAMEN	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANOMATERIALI IN NANODELCI	3
2.1.1 Vpliv nanodelcev na metabolizem lipidov	4
2.1.2 Nanodelci, uporabljeni v nalogi	4
2.2 LAMELARNA TELESCA IN FOSFOLIPIDOZA	5
2.2.1 Metode za ugotavljanje prisotnosti lamelarnih telesc	7
2.3 ČLOVEŠKE PLJUČNE CELICE A549	7
2.4 METODE, UPORABLJENE V NALOGI	8
2.4.1 Ugotavljanje citotoksičnosti nanodelcev	8
2.4.2 Vrednotenje količine fosfolipidov (prisotnosti lamelarnih telesc) v celicah	9
2.4.3 Merjenje intenzivnosti fluorescence	9
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 GOJENJE CELIC	10
3.1.1 Presajanje celic	10
3.2 PRIPRAVA SUSPENZIJ NANODELCEV	10
3.3 TEST MTT	11
3.3.1 Priprava vzorcev	11
3.3.2 Spektrofotometrično merjenje absorbance	11
3.4 TEST PRIVZEMA BARVILA NEVTRALNO RDEČE (NR).....	12
3.4.1 Priprava vzorcev	12
3.4.2 Spektrofotometrično merjenje absorbance	12
3.5 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA.....	12
3.5.1 Priprava vzorcev	12
3.5.2 Pregled mikroskopskih preparatov	13
3.6 PRETOČNA CITOMETRIJA	13
3.6.1 Priprava vzorcev	13
3.6.2 Merjenje intenzivnosti fluorescence celic na pretočnem citometru	14
3.7 ANALIZA PODATKOV	15
3.7.1 Analiza rezultatov testa MTT in testa privzema barvila NR	15
3.7.2 Analiza rezultatov, dobljenih z uporabo pretočnega citometra	15
4 REZULTATI	16
4.1 REZULTATI TESTOV CITOTOKSIČNOSTI	16
4.1.1 Citotoksičnost, izzvana z nanodelci CuO	16

4.1.1.1 Rezultati, pridobljeni s testom MTT.....	16
4.1.1.2 Rezultati, pridobljeni s testom privzema barvila NR.....	17
4.1.2 Citotoksičnost, izzvana z nanodelci SiO₂.....	18
4.1.2.1 Rezultati, pridobljeni s testom MTT.....	18
4.1.2.2 Rezultati, pridobljeni s testom privzema barvila NR.....	19
4.2 REZULTATI PREGLEDA FLUORESCENTNO OBARVANIH PREPARATOV Z EPIFLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM.....	20
4.2.1 Količine fosfolipidov v celicah, tretiranih z nanodelci CuO.....	22
4.2.2 Količine fosfolipidov v celicah, tretiranih z nanodelci SiO₂.....	25
4.3 REZULTATI MERITEV INTENZIVNOSTI FLUORESCENCE NA PRETOČNEM CITOMETRU.....	28
5 RAZPRAVA.....	32
5.1 VPLIV NANODELCEV NA METABOLIZEM CELIC.....	32
5.2 TVORBA LAMELARNIH TELESC.....	33
6 SKLEPI.....	35
7 POVZETEK.....	36
8 VIRI.....	38
ZAHVALA	
PRILOGA	

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Strukturna formula propranolola	6
Sl. 2:	Rezultati testa MTT pri tretiranju celic z nanodelci CuO (nano-CuO)	17
Sl. 3:	Rezultati testa privzema barvila nevtralnno rdeče pri tretiranju celic z nanodelci CuO (nano-CuO)	18
Sl. 4:	Rezultati testa MTT pri tretiranju celic z nanodelci SiO ₂ (nano-SiO ₂)	19
Sl. 5:	Rezultati testa privzema barvila nevtralnno rdeče pri tretiranju celic z nanodelci SiO ₂ (nano-SiO ₂)	20
Sl. 6:	Posnetek celic negativne kontrole pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom	21
Sl. 7:	Posnetek celic, tretiranih s 30- μ M propranololom (pozitivna kontrola) pri 40-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom	22
Sl. 8:	Posnetek celic, tretiranih z nano-CuO v koncentraciji 2 μ g/mL pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom	23
Sl. 9:	Posnetek celic, tretiranih z nano-CuO v koncentraciji 5 μ g/mL pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom	24
Sl. 10:	Posnetek celic, tretiranih z nano-CuO v koncentraciji 10 μ g/mL pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom	25
Sl. 11:	Posnetek celic, tretiranih z nano-SiO ₂ v koncentraciji 10 μ g/mL pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom	26
Sl. 12:	Posnetek celic, tretiranih z nano-SiO ₂ v koncentraciji 50 μ g/mL pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom	27
Sl. 13:	Rezultati meritev na pretočnem citometru pri 12-, 24- in 48-urnem tretiranju celic z nano-CuO	29
Sl. 14:	Rezultati meritev na pretočnem citometru pri 72-urnem in 7-dnevnem tretiranju celic z nano-CuO	30
Sl. 15:	Rezultati meritev na pretočnem citometru pri 12-, 24- in 48-urnem tretiranju celic z nano-SiO ₂	31

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Koncentracije nanodelcev SiO ₂ (nano-SiO ₂) in CuO (nano-CuO), uporabljene pri izvedbi testa MTT in testa privzema barvila nevtralnno rdeče (NR)	11
Pregl. 2: Koncentracije nano-SiO ₂ in nano-CuO, uporabljene pri pripravi vzorcev za ovrednotenje količine lamelarnih telesc s pomočjo fluorescenčne mikroskopije	13
Pregl. 3: Koncentracije nano-SiO ₂ in nano-CuO, uporabljene pri pripravi vzorcev za meritve fluorescence celic s pomočjo pretočne citometrije	14

SLOVARČEK

avtoklaviranje	Postopek sterilizacije s pomočjo pregrete pare pri povišanem tlaku
DLS	Dinamično sipanje svetlobe (ang. dynamical light scattering)
DMEM	Celični medij (ang. Dulbecco's modified eagle's medium)
DMSO	Dimetil sulfoksid
FBS	Fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum)
formazan	Produkt, v katerega encimi v mitohondrijih pretvorijo barvilo MTT
mTOR	Kinaza sesalski receptor za rapamicin (ang. mammalian target of rapamicyne)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid
nano-CuO	Nanodelci bakrovega oksida
nano-SiO ₂	Nanodelci silicijevega dioksida
NR	Nevtralno rdeče
PBS	Fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline)
PI3K	Kinaza fosfoinozitol 3 (ang. phosphoinositol 3 kinase)
rcf	Relativna centrifugirna sila (ang. relative centrifugal force)
ROS	Reaktivne kisikove spojine
rpm	Obrati na minuto (ang. revolutions per minute)
soniciranje (sonifikacija)	Ultrazvočna obdelava, ki razbije skupke materialov v suspenziji
TEM	Transmisijski elektronski mikroskop
tripsinizacija	Odlepljanje celic s podlage s pomočjo encima tripsin, ki cepi medcelične vezi

1 UVOD

Nanotehnologija se je v zadnjih desetletjih močno razvila, zato se uporaba nanomaterialov za različne namene povečuje. V stik z ljudmi in drugimi organizmi prihaja vedno več antropogenih nanomaterialov. Posledica tega je potreba po boljšem razumevanju vpliva nanomaterialov in njihovih sestavnih delov na živalske organizme in njihove organe ter celice. Različni nanomateriali imajo zaradi različnih kemijskih lastnosti različne vplive na celice (Buzea in sod., 2007; Karlsson in sod., 2008).

Opravljenih je bilo že veliko raziskav o strupenostnih učinkih nanomaterialov na živalske organizme, vendar pa mehanizmi teh učinkov še vedno niso povsem jasni. Še manj pa se ve o učinkih nanomaterialov, ki jih ne smatramo za toksične. Poleg tega je le malo znanega tudi o vplivu različnih snovi na metabolizem lipidov v celicah. Med take vplive spada tudi povečana tvorba lamelarnih telesc (Anderson in Borlak, 2006).

Lamelarna telesca so skupki fosfolipidov v celicah, ki običajno služijo kot zaloga fosfolipidov. Njihova povečana količina je znak pojava fosfolipidoze. Fosfolipidoza je stanje okvarjenega delovanja lizosomov, ki se odraža v zmanjšani razgradnji fosfolipidov, ti pa se zato nalagajo v obliki lamelarnih telesc (Reasor, 1989; Anderson in Borlak, 2006).

Do fosfolipidoze pride lahko zaradi redkih genetskih napak ali zaradi vnosa t.i. amfifilnih kationskih zdravil v celice. Pred kratkim pa so opazili pojav kopičenja fosfolipidov tudi kot posledico stika celic z nekaterimi nanomateriali (Ma in sod., 2012; Wang in Petersen, 2013).

1.1 HIPOTEZE

1. Nanodelci zaradi motenja metabolizma fosfolipidov sprožijo povečano tvorbo lamelarnih telesc v celicah A549.
2. Ker različni nanodelci različno vplivajo na procese v celicah, je inteziteta povečanja tvorbe lamelarnih telesc ob izpostavljenosti celic različnim nanodelcem različna.

1.2 NAMEN

Namen naše naloge je prilagoditev in optimizacija metode za ugotavljanje prisotnosti lamelarnih telesc v človeških pljučnih celicah A549 s pomočjo fluorescentnih barvil. Barvilo, ki smo ga uporabili, je namenjeno ugotavljanju pojava fosfolipidoze (Shahane in sod., 2013). Nioi in sodelavci (2007) so ugotovili, da zanesljivost uporabe barvila LipidTOX za vrednotenje fosfolipidoze 100-odstotno zanesljiva.

S prilagojeno metodo smo želeli preveriti ali nanodelci silicijevega dioksida in bakrovega oksida motijo metabolizem fosfolipidov, tako da sprožijo povečano tvorbo lamelarnih telesc v celicah.

Z dobljenimi rezultati smo želeli vsaj delno razjasniti vpliv nanomaterialov na biološke procese v celicah, predvsem na metabolizem in sintezo lipidov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANOMATERIALI IN NANODELCI

Nanomateriali so materiali, ki so sestavljeni iz komponent, manjših od nekaj 100 nm vsaj v eni dimenziji. Nanodelci so najpogosteje uporabljeni nanomateriali. Zaradi majhnosti imajo nanodelci drugačne fizikalne lastnosti in kemijsko reaktivnost kot delci, večji od nekaj 100 nm iz istega materiala (Buzea in sod., 2007). Predvsem je pomembno visoko razmerje med površino in volumnom nanodelcev – specifična površina. Zaradi visoke specifične površine imajo nanodelci višjo površinsko reaktivnost kot delci, večji od nekaj 100 nm (Jang in sod., 2001).

Vir izpred 12 let navaja, da je večina nanodelcev, ki jih najdemo v naravi, naravnega izvora, le okoli 10 % nanodelcev je antropogenega izvora (Taylor, 2002). Antropogeni nanodelci so stranski produkti pri izgorevanju (npr. nanodelci avtomobilskih izpuhov), v zadnjih desetletjih pa nastajajo tudi pri različnih industrijskih procesih. Ker se nanotehnologija hitro razvija in širi, se povečuje tudi količina nanodelcev industrijskega izvora, ki pridejo v stik z ljudmi in drugimi organizmi (Buzea in sod., 2007). Umetno proizvedeni nanomateriali se uporabljajo na različnih področjih, in sicer v kemijski industriji, energetiki, informacijskih tehnologijah, v tekstilni in prehrabni industriji, kozmetiki in gradbeništvu ter v medicini in bioloških vedah (Buzea in sod., 2007). V biomedicinskih področjih se na primer razvija metodologija ciljanega dostavljanja zdravil s pomočjo nanodelcev (Cho in sod., 2008).

Nanomateriali pridejo v stik z ljudmi in drugimi vretenčarji najpogosteje prek kože, prebavnega trakta ali dihal. Ker so majhni, lahko iz teh vstopnih predelov preidejo v obtočila, iz obtočil pa do drugih organov in celic (Buzea in sod., 2007).

Nanodelci vstopajo v celice s pomočjo fagocitoze, makropinocitoze ali difuzije. Način vstopa je odvisen od vrste nanomaterialov, natančneje od fizikalno-kemičnih lastnosti materiala (npr. od velikosti, oblike, naboja, tvorbe skupkov) pa tudi od tipa celic, v katere vstopajo (Unfried in sod., 2007).

Citotoksičnost nanodelcev izvira iz poškodbe celičnih organelov; njihova najpogostejša tarča so plazemske membrane in njihovi encimski kompleksi ter mitohondriji in endoplazemski retikulum. Poškodbe mitohondrijev lahko sprožijo apoptozo celice (programirano celično smrt) (Unfried in sod., 2007). Poleg tega pa imajo nanodelci, ki vplivajo tudi na delovanje celičnega jedra, genotoksične lastnosti – povzročajo poškodbe genskega zapisa (Schins in Knaapen, 2007; Unfried in sod., 2007).

Dokazano je tudi, da se nanodelci kopičijo v lizosomih (Shapero in sod., 2011). Pri tem lahko povzročajo napake v delovanju lizosomov, kar pripelje na primer do nabiranja nerazgrajenih substratov v lizosomih. Posledica napak v delovanju lizosomov je, da se

poruši homeostaza teh substratov, lahko pa pride tudi do napak v celičnem transportu in signalizaciji (Stern in sod., 2012).

Mnogi nanomateriali povzročajo škodo celicam tudi prek oksidativnega stresa, ki ga povzročijo s sproženjem nastanka reaktivnih kisikovih spojin (ROS) (Buzea in sod., 2007). ROS lahko povzročijo oksidativne poškodbe biomolekul (tudi DNA), poleg tega pa služijo tudi kot signalne molekule in z njihovim nastankom nanodelci sprožijo signalne kaskade, ki vplivajo na proliferacijo celic, celično smrt in vnetne odzive (Unfried in sod., 2007). Ena od teh kaskad vključuje aktivacijo kaspaz, ki so pomembne komponente pri sproženju apoptoze (Kang in sod., 2009; Mukherjee in Byrne, 2013).

2.1.1 Vpliv nanodelcev na metabolizem lipidov

Nanodelci prek vpliva na signalne poti v celicah lahko vplivajo tudi na metabolizem lipidov. Raziskava, ki so jo opravili Wang in sodelavci (2012), je pokazala, da zlati nanodelci pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*) vplivajo na delovanje signalizacije, povezane s potjo, v kateri sodelujejo različne kinaze, ki imajo ključno vlogo pri nadzoru metabolizma celic. Med temi je tudi kinaza, ki je receptor za rapamicin (mTOR) in je posebej pomembna za nadzor metabolizma in sinteze lipidov. Kinaza mTOR ob aktivaciji posredno sproži prepisovanje genov, katerih produkti sodelujejo pri sintezi različnih lipidov (maščobne kisline, holesterol, sfingolipidi, fosfatidil holin in fosfatidil glicerol) (Peterson in sod., 2011; Laplante in Sabatini, 2009).

Wang in sodelavci (2012) so pri ličinkah vinskih mušic, ki so jih hranili z zlatimi nanodelci, opazili povečano aktivnost kinaze fosfoinozitol 3 (PI3K), kinaze Akt in kinaze mTOR ter povečane ravni lipidov v celicah maščobnih telesc. Mehanizem povečane aktivnosti teh kinaz so razlagali s povečanjem celičnega privzema nutrientov, ki ga sprožijo nanodelci, ali pa z aktivacijo kinaz Akt in PI3K, ki se poveča zaradi spremembe oblike celične membrane ob endocitozi nanodelcev.

Čeprav je bilo opravljenih že veliko raziskav za ugotavljanje, kako različni nanodelci delujejo na različne organizme, organe ali celice, mehanizmi njihovega vpliva na biološke sisteme še vedno niso popolnoma jasni. Pri tem so posebno malo raziskani učinki, ki jih štejemo za škodljive; mednje spada tudi tvorba lamelarnih telesc (Anderson in Borlak, 2006).

2.1.2 Nanodelci, uporabljeni v nalogi

V nalogi smo uporabili nanodelce silicijevega dioksida (nano-SiO₂) in nanodelce bakrovega oksida (nano-CuO).

Nano-SiO₂ med drugim uporabljajo za izdelavo avtomobilskih gum, ciljano dostavo zdravil, terapijo proti raku in za biosenzorje (Yang in sod., 2010).

V nalogi uporabljeni nano-SiO₂ imajo naslednje lastnosti: zeta potencial (elektrokinetični potencial pri koloidnih disperzijah) je -27 mV, povprečna velikost, dobljena s pomočjo meritev dinamičnega sipanja svetlobe (DLS – ang. dynamical light scattering), je v deionizirani vodi 488 nm, v celičnem mediju (DMEM - ang. Dulbecco's modified eagle's medium) pa 719 nm.

Nano-CuO se uporabljajo kot industrijski katalizatorji ter pri izdelavi polprevodnikov, baterij, mikroelektronskih naprav, barv, tekstila in plastike (Siddiqui in sod., 2013; Dastjerdi in Montazer, 2010).

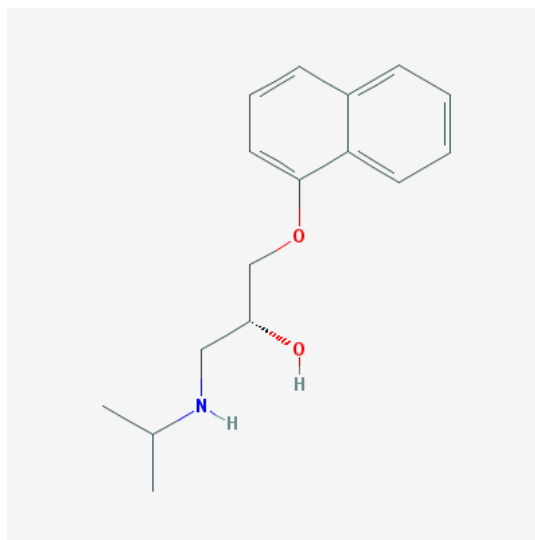
Lastnosti v nalogi uporabljenih nano-CuO so naslednje: v destilirani vodi je zeta potencial -24 mV, v pufru PBS pa -16 mV, v obeh je povprečna velikost, dobljena s pomočjo meritev DLS, med 500 nm in 1 μm. Stopnja odtapljanja bakrovih ionov z uporabljenih nano-CuO je v destilirani vodi majhna, v celičnem mediju pa visoka (priloga B).

2.2 LAMELARNA TELESCA IN FOSFOLIPIDOZA

Lamelarna telesca so znotrajcelične strukture - skupki fosfolipidov, ki v običajnih pogojih služijo znotrajceličnemu shranjevanju fosfolipidov in njihovi sekreciji (Schmitz in Müller, 1991). Veliko jih je predvsem v pljučnih celicah, kjer se fosfolipidi uporabljajo kot surfaktanti (Mason in Crystal, 1998). Opažena so bila tudi v endotelnih celicah, celicah pljučnega mezotelija, celicah sluznice prebavnega trakta in nekaterih drugih tipih celic vretenčarjev (Schmitz in Müller, 1991).

Povečano število lamelarnih telesc v celicah je morfološki znak prisotnosti fosfolipidoze (Reasor, 1989). Fosfolipidoza je stanje, kjer pride do zmanjšane stopnje razgrajevanja lipidov v lizosomih (Anderson in Borlak, 2006). Do takih motenj v delovanju lizosomov lahko pride zaradi genetskih napak, na primer pri Niemann-Pickovi bolezni, kjer gre za mutacije v genih, ki sodelujejo pri transportu in razgradnji fosfolipidov in holesterola (Roszell in sod., 2012).

Do fosfolipidoze pa lahko pride tudi zaradi vnosa t.i. amfifilnih kationskih zdravil v celico. To so zdravila, katerih kemijska zgradba vključuje hidrofilni obroč in hidrofobne regije. Takih zdravil je več kot 50, mednje pa spadajo nekateri antibiotiki, antidepresivi, antipsihotiki, zdravila za zdravljenje aritmij in nekatera druga zdravila (Anderson in Borlak, 2006). Med bolj znana amfifilna kationska zdravila spada propranolol (blokator beta receptorjev adrenergičnega sistema), ki je kot pozitivna kontrola uporabljen tudi v naši nalogi (stukturna formula je prikazana na sliki 1). Propranolol se v klinične namene uporablja kot sredstvo proti hipertenziji, srčnim aritmijam, glavkomu, tremorju in nekaterim drugim simptomom (Rang in sod., 2012: 183).



Slika 1: Strukturna formula propranolola (Propranolol..., 2014)

Obstaja več hipotez o mehanizmu nastanka z zdravili spodbujene fosfolipidoze. Halliwell (1997) je predpostavljala, da do fosfolipidoze pride, ker so amfifilna kationska zdravila, ki imajo bazične lastnosti, zaradi kislosti v lizosomu protonirana. Protonirana oblika zdravila ne more prehajati preko hidrofobne membrane lizosoma in je v lizosomu ujeta. Zaradi vezave amfifilnih kationskih zdravil na fosfolipide nastanejo kompleksi, ki niso razgradljivi in se kopičijo v obliki lamelarnih telesc (Halliwell, 1997).

Druga hipoteza predpostavlja, da je nastanek lamelarnih telesc povezan z inhibicijo delovanja fosfolipaz. Nekatera kationska amfifilna zdravila (npr. propranolol, klorokin) naj bi inhibirala delovanje fosfolipaz A1, A2 in C z direktno vezavo na te encime (Halliwell, 1997). Druga možnost je, da pride do inhibicije delovanja fosfolipaze A1 zaradi nevtralizacije naboja membrane lizosoma, ki jo povzročijo kationska amfifilna zdravila (Mingeot-Leclercq in sod., 1988). Do inaktivacije lizosomskih encimov bi lahko prišlo tudi zaradi povišanja vrednosti lizosomskega pH, ki ga povzroči kopičenje bazičnih amfifilnih kationskih zdravil v lizosomu (Lüllman in sod., 1978).

Ena od teorij pravi, da do fosfolipidoze pride zaradi povečane sinteze fosfolipidov in holesterola v celici (Hutchinson, 2008; Sawada in sod., 2005).

Reasor in Kacew (2001) ter Lowe in sodelavci (2012) so predpostavljali, da obstaja velika verjetnost, da različne snovi povzročajo fosfolipidozo prek različnih mehanizmov. Poleg tega so Lowe in sodelavci (2012) s pomočjo uporabe računalniškega modela izračunali, da sta verjetna mehanizma sprožitve fosfolipidoze tako inhibicija delovanja fosfolipaz kot tudi povečana biosinteza holesterola.

Fosfolipidoza oziroma nastanek lamelarnih telesc bi bil, po mnenju nekaterih raziskovalcev, lahko tudi celični mehanizem razstrupljanja, ki ščiti celice pred amfifilnimi

ksenobiotiki. Opazili so namreč, da so bila lamelarna telesca eksocitirana, kar bi lahko bil način izločanja teh snovi iz celic (Wang in Petersen, 2013; Ma in sod., 2011).

Poleg amfifilnih kationskih zdravil naj bi fosfolipidozo povzročali tudi nekateri nanomateriali. Wang in Petersen (2013) sta ugotovila, da z lipidi obdani zlati nanodelci povzročajo povečanje tvorbe lamelarnih telesc v človeških pnevmocitih A549. Predpostavljala sta, da je tvorba lamelarnih telesc celični mehanizem za izolacijo in odstranjevanje zlatih nanodelcev iz celice.

Podobno razlago so predstavili tudi Simon-Deckers in sodelavci (2008), ki so opazili, da je pri človeških pljučnih celicah A549, izpostavljenih ogljikovim nanocevkam, prisotnih več lamelarnih telesc kot pri kontrolnih celicah.

Tudi Ma in sodelavci (2011, 2012) so pri izpostavitvi alveolarnih makrofagov nanodelcem cerijevega oksida (CeO_2) opazili povečano količino lamelarnih telesc v teh celicah in njihovi okolici.

Schleh in sodelavci (2009) so ob izpostavitvi pljučnih surfaktantov nanodelcem titanovega dioksida opazili pojav deformacije in zmanjšanja lamelarnih telesc, obenem pa tudi povečano količino unilamelarnih veziklov. Hkrati so opazili tudi, da so se manjši skupki nanodelcev nakopičili med lamelami lamelarnih telesc.

Tudi druge raziskave so pokazale, da se različni nanomateriali kopičijo znotraj lamelarnih telesc (Singh in sod., 2007; Stearns in sod. 2011).

2.2.1 Metode za ugotavljanje prisotnosti lamelarnih telesc

Pojav fosfolipidoze se določa z vrednotenjem prisotnosti lamelarnih telesc v celicah. Doslje se prisotnost in količino lamelarnih telesc najpogosteje in najučinkoviteje določa z uporabo transmisijskega elektronskega mikroskopa (TEM). Ker so metode pri uporabi TEM dolgotrajne in zapletene, mnogi poskušajo najti druge metode za ovrednotenje pojava fosfolipidoze (Shahane in sod., 2013). Nekateri so to poskušali z vrednotenjem izražanja genov, ki sovpadajo s pojavom fosfolipidoze (Monteith s sod., 2006; Nioi s sod., 2007; Atienzar in sod., 2006). V zadnjem času pa se kot metoda za opredelitev prisotnosti fosfolipidoze v celicah uveljavlja uporaba fluorescentnih barvil, kot so HCS LipidTOX, NBD-PE (difitanoil glicero fosfoetanolamin nitro benzoksadiazolil), NBD-PC (palmitoil nitrobenzoksadiazolil aminoheksanil glicerofosfoholin) in Nil rdeče (Mesens s sod., 2009; Nioi s sod., 2007; Park s sod., 2012; Shahane s sod., 2013).

2.3 ČLOVEŠKE PLJUČNE CELICE A549

Celična linija A549 izvira iz človeškega pljučnega adenokarcinoma in predstavlja model pnevmocitov tipa II (Nardone in Andrews, 1979). Celice A549 tvorijo plasti z enakimi

lastnostmi, kot jih imajo pnevmociti tipa II. Med drugim vsebujejo za pnevmocite tipa II značilna lamelarna telesca, ki so enakomerno porazdeljena po celicah (Foster in sod., 1998). Ta so pomembna za izdelavo surfaktantov, saj so pnevmociti tipa II v dihalnih poteh odgovorni za preprečitev zlepljanja pljučnih mešičkov, kar je doseženo s pomočjo surfaktantov (Van Lenten in sod., 2004; Schleh in sod., 2009).

Celično linijo A549 so uporabili v mnogih raziskavah iz različnih področij, tako v zvezi z metabolizmom zdravil (Foster in sod., 1998) in imunologijo (Roy in sod., 2014) kot tudi s toksikologijo. Preučevali so tudi vpliv različnih nanodelcev na celice A549, med drugim tudi vpliv nano-SiO₂ (Nowak in sod., 2014) in nano-CuO (Ahamed in sod., 2010) na te celice.

2.4 METODE, UPORABLJENE V NALOGI

V nalogi smo uporabili metode za ugotavljanje citotoksičnosti nanodelcev ter fluorescentno barvanje in metode za merjenje intenzivnosti fluorescence celic.

2.4.1 Ugotavljanje citotoksičnosti nanodelcev

Da bi ugotovili, katere koncentracije nanodelcev so za celice A549 citotoksične, smo v nalogi uporabili test citotoksičnosti z reagentom 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijevim bromidom (MTT) in test privzema barvila nevtralnno rdeče (NR).

Test MTT temelji na pretvorbi spojine MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) v kristale formazana v mitohondrijih živih celic. S tem se določi metabolno aktivnost celic. Bistvo te metode je, da pri reakciji pretvorbe MTT v formazan pride do spremembe barve: MTT je rumen, formazan pa vijoličen. Bolj ko je določena spojina strupena, več bo mrtvih celic, ki niso metabolno aktivne in posledično bo absorbanca, izmerjena v vijoličnem spektru, nižja (Čemažar in sod., 2013). Test privzema barvila NR pa nam poda informacijo o stabilnosti lizosomov v celicah (Repetto in sod., 2008).

Test privzema barvila nevtralnno rdeče nam da informacijo o metabolizmu celic in stabilnosti lizosomov. Temelji na sposobnosti viabilnih celic, da v lizosomih vežejo barvilo nevtralnno rdeče. Za privzem barvila je potrebna energija, s katero so vzpostavljene kisle vrednosti pH v lizosomih. Torej bolj ko je tretma strupen, manj barvila nevtralnno rdeče bodo celice privzele, kar se bo poznalo na izmerjenih vrednostih absorbance (Repetto in sod., 2008).

2.4.2 Vrednotenje količine fosfolipidov (prisotnosti lamelarnih telesc) v celicah

Za vrednotenje količine fosfolipidov (morda lamelarnih telesc) v celicah smo uporabili fluorescentno barvilo, vezano na fosfolipide HSE LipidTOX (LipidTOX). To barvilo za celice ni citotoksično, deluje pa tako, da ga dodamo v celično gojišče in pustimo, da celice uporabijo fosfolipide iz barvila LipidTOX. Osnovni princip vrednotenja količine fosfolipidov v celicah s pomočjo barvila LipidTOX je, da celice, pri katerih pride do okvar v metabolizmu fosfolipidov, privzemajo in kopičijo večje količine s fluorescentnim barvilom označenih fosfolipidov kot celice, pri katerih fosfolipidoze ni, in je posledično izmerjena fluorescenca pri teh celicah močnejša (HCS..., 2006). Po mnenju Nioi in sodelavcev (2007), ki so v svoji raziskavi preverjali učinkovitost dveh metod (izražanje določenih genov in uporaba barvila LipidTOX) za ovrednotenje pojava fosfolipidoze, je zanesljivost uporabe barvila LipidTOX za vrednotenje fosfolipidoze 100-odstotno zanesljiva. Zanesljivost teh metod so v omenjeni raziskavi opredelili tako, da so preverili ali metodi pokažeta pozitiven rezultat za fosfolipidozo pri tretiranju celic z zdravili, ki so znani povzročitelji fosfolipidoze ter z zdravili, ki naj fosfolipidoze ne bi povzročala.

2.4.3 Merjenje intenzivnosti fluorescence

Intenzivnost fluorescence smo merili s pomočjo pretočne citometrije, obenem pa smo z epifluorescenčnim mikroskopom pregledali preparate celic, obarvanih s fluorescentnim barvilom LipidTOX.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 GOJENJE CELIC

Celice smo shranjevali in presajali v celičnem laboratoriju na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Človeške pljučne celice A549 (ATCC, Manassas, Virginia, ZDA) smo gojili v celičnem mediju DMEM (Sigma-Aldrich) z dodanim fetalnim govejim serumom (FBS – ang. fetal bovine serum), L-glutaminom in antibiotikoma penicilinom in streptomycinom v inkubatorju Memmert s 5 % CO₂ in vlaženim ozračjem pri 37 °C. Vsi reagenti in ostali materiali, ki so prišli v stik s celicami, so bili sterilni.

3.1.1 Presajanje celic

Celice smo presajali enkrat na 3–4 dni. Presadili smo jih v laminarni vertikalni komori MC 12-1 (Iskra PIO). Najprej smo odstranili medij, celice dvakrat sprali s fosfatnim pufrom (PBS – ang. phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich) in jih tripsinizirali 6 minut z 1–1,5 mL tripsina TripleSelect. Po tripsinizaciji smo celice prestavili v 15-mililitrsko centrifugirko in jih skupaj z medijem centrifugirali 5 minut pri 1100 obratih na minuto (rpm) v centrifugi Centric 322B (Tehtnica). Po tem smo supernatant odlili in dodali 10 mL medija, premešali in celice prešteli na citometru Bürker-Türk s svetlobnim invertnim mikroskopom Axio Vert.A1 (Zeiss). Celice smo presadili v posodico Nunc (Thermo Scientific) s površino 25 oziroma 75 cm², in sicer $2,5 \times 10^4$ celic na cm².

3.2 PRIPRAVA SUSPENZIJ NANODELCEV

Suspenzije nanodelcev smo pripravili tako, da smo na tehtnici AB54-S (Metler Toledo) natehtali ustrezne količine nanodelcev in jih razredčili v destilirani vodi, tako da smo dobili suspenzije koncentracije 10 mg/mL. Nanodelce smo tehtali v Laboratoriju za splošno zoologijo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Suspenzije nanodelcev smo dali pred uporabo v avtoklav.

Uporabili smo nano-SiO₂, ki smo jih prejeli od sodelavcev v evropskem projektu NanoValid, in nano-CuO (Sigma Aldrich). Karakterizacijo obojih nanodelcev so opravili sodelavci iz evropskega projekta NanoValid (nekaj rezultatov karakterizacije je prikazanih v prilogi A).

Pred pripravo nanodelcev različnih koncentracij za tretiranje celic smo pripravljene suspenzije nanodelcev vsaj 30 minut sonicirali v ultrazvočni vodni kopeli Sonis (Iskra Pio) v Histološkem laboratoriju na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.3 TEST MTT

Test MTT smo uporabili za merjenje vpliva nano-SiO₂ in nano-CuO na metabolizem celic A549.

3.3.1 Priprava vzorcev

Vzorci za test MTT smo pripravili v celičnem laboratoriju na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Celice A549 smo nasadili v mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami, tako da je bilo v eni vdolbinici 7000 celic. Celice smo nasadili le v 8 stolpcev, v ostale 4 pa smo dodali po 100 µL medija. Celice smo potem za 24 ur pustili v inkubatorju pri 37 °C, da so se pritrdile na dno vdolbinic. Po inkubaciji smo v vdolbinice dodali 50 µL suspenzije nanodelcev, ki smo jo pred tem 30 minut sonicirali in jo razredčili v mediju, tako da smo dobili nanodelce v različnih koncentracijah. Naredili smo tudi negativno kontrolo, kjer smo celicam dodali 50 µL medija, ter pozitivno kontrolo, kjer smo jim dodali 50 µL 0,75 mM vodikovega peroksida. Celice s tretmaji in kontrole smo pustili za 24 ur v inkubatorju pri 37 °C.

Koncentracije nanodelcev, ki smo jih uporabili, so se razlikovale glede na vrsto nanodelcev in so prikazane v preglednici 1. Za vsak posamezen tretma smo naredili 8 ponovitev.

Preglednica 1: Koncentracije nanodelcev SiO₂ (nano-SiO₂) in CuO (nano-CuO), uporabljene pri izvedbi testa MTT in testa privzema barvila nevtralnno rdeče (NR)

Vrsta nanodelcev	Uporabljene koncentracije [µg/mL]
nano-CuO	1, 2, 5, 10, 50 in 100
nano-SiO ₂	1, 5, 10, 50 in 100

Po tretiranju celic smo v vsako vdolbinico dodali 15 µL MTT in celice vrnili v inkubator za 3 ure, da je potekla indikatorska reakcija. Po treh urah smo izsesali medij in v vsako vdolbinico dodali 100 µL topila za formazan – dimetil sulfoksid (DMSO). Po dodatku DMSO smo nekaj minut počakali in pretresli mikrotitrsko ploščo, da so se kristali formazana dobro raztopili.

3.3.2 Spektrofotometrično merjenje absorbance

Intenzivnost absorbance vsebine posamezne vdolbinice na mikrotitrski plošči smo merili pri 570 nm na mikročitalcu Dynex Revelation (Dynex Technologies) v merilnici na Katedri za biokemijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.4 TEST PRIVZEMA BARVILA NEVTRALNO RDEČE (NR)

Test privzema barvila NR smo uporabili za merjenje vpliva nano-SiO₂ in nano-CuO na metabolizem celic A549.

3.4.1 Priprava vzorcev

Priprava vzorcev za test privzema barvila NR je potekala enako kot priprava vzorcev za test citotoksičnosti MTT, s to razliko, da smo po tretiranju celic namesto reagenta MTT dodali 16 µL 0,4 mg/mL barvila NR, ki smo ga pred uporabo pretresli na rotacijskem mešalniku Vortexer (select BioProducts), in celice vrnili v inkubator za 2 uri, da je potekla indikatorska reakcija. Po dveh urah smo izsesali medij in v vsako vdolbinico dodali 100 µL topila za barvilo NR, ki vsebuje 1 % oetne kisline, 50 % etilnega alkohola in 49 % destilirane vode. Po dodatku tega topila smo nekaj minut počakali in pretresli mikrotitrsko ploščo, da so se kristali barvila dobro raztopili.

Koncentracije nanodelcev, ki smo jih uporabili za ta test, so bile enake kot za test MTT (pregl. 1). Za vsak posamezen tretma smo naredili 8 ponovitev.

3.4.2 Spektrofotometrično merjenje absorbance

Intenzivnost absorbance vsebine posamezne vdolbinice na mikrotitrski plošči smo merili pri 550 nm na mikročitalcu Dynex Revelation proizvajalca Dynex Technologies v merilnici na Katedri za Biokemijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.5 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

S pomočjo epifluorescenčnega mikroskopa smo pregledali preparate celic, obarvanih s fluorescentnim barvilom LipidTOX (Invitrogen), in vizulano ocenili količino fosfolipidov v celicah.

Vzorce smo pripravili v celičnem laboratoriju na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Mikroskopske preparate smo pregledali v mikroskopirnici na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.5.1 Priprava vzorcev

Celice A549 smo nasadili na plošče s 24 vdolbinicami, v katere smo položili stekelca s premerom 10 oziroma 12 mm. V vdolbinice smo nasadili $1,5 \times 10^4$ celic na cm² in jih pustili v inkubatorju 24 ur pri 37 °C, da so se celice pritrdirile na podlago. Po 24 urah smo iz

vdolbinic izsesali medij in celice tretirali s 150 μL suspenzije nanodelcev, ki smo jo pred tem 30 minut sonicirali in jo razredčili v mediju, tako da smo dobili nanodelce v različnih koncentracijah. Naredili smo tudi negativno kontrolo s 150 μL medija in pozitivno kontrolo s 150 μL 30- μM propranolola. V vdolbinice s tretmaji in kontrolami smo dodali še 150 μL s fluorescentnim barvilom označenih fosfolipidov LipidTOX (Invitrogen). LipidTOX je bil pripravljen po navodilih proizvajalca (HCS..., 2006). Celice smo tretirali 48 ur v inkubatorju pri 37 °C.

Pri pripravi vzorcev za vrednotenje prisotnosti fosfolipidoze v celicah smo pri svojem delu uporabili nanodelce v koncentracijah, ki za celice A549 niso zelo strupene, da ne bi preveč celic odmrlo pred meritvami. Uporabljene koncentracije so prikazane v preglednici 2.

Preglednica 2: Koncentracije nano-SiO₂ in nano-CuO, uporabljene pri pripravi vzorcev za ovrednotenje količine lamelarnih telesc s pomočjo fluorescenčne mikroskopije

Vrsta nanodelcev	Uporabljene koncentracije [$\mu\text{g/mL}$]
nano-CuO	2, 5 in 10
nano-SiO ₂	10 in 50

Po tretiranju smo odsesali medij, celice sprali s pufrom PBS in dodali 1 mL 3,5 % formaldehida za fiksacijo celic. Po 20-minutni fiksaciji smo stekelca ponovno sprali s pufrom PBS in jih položili na objektna stekelca, na katera smo prej kapnili kapljico nosilnega medija Vectashield (Vector laboratories), ki je upočasnil bledenje fluorescence. Uporabljeni nosilni medij vsebuje tudi fluorescentno barvilo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), ki modro obarva DNA in služi za lažjo lokalizacijo celic.

3.5.2 Pregled mikroskopskih preparatov

Preparate smo opazovali z epifluorescenčnim mikroskopom AxioImager.Z1 (Zeiss). Za ekscitacijo fluorescence smo uporabljali svetlobo valovne dolžine 450–490 nm. Slike smo zajeli s pomočjo programa AxioVision. Pri 400-kratni povečavi je bil čas izpostavitve 1,28 s, intenzivnost svetlobe pa 76%.

3.6 PRETOČNA CITOMETRIJA

S pomočjo pretočnega citometra smo ovrednotili količino fosfolipidov v celicah, obarvanih s fluorescentnim barvilom LipidTOX.

3.6.1 Priprava vzorcev

Vzorci za meritve na pretočnem citometru smo pripravili v celičnem laboratoriju na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Celice A549 smo nasadili na mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami, tako da je bilo v eni vdolbinici 15000 celic. Celice smo za 24 ur pustili v inkubatorju pri 37 °C, da so se pritrdile na dno vdolbinic. Potem smo iz vdolbinic izsesali medij in dodali 50 µL suspenzije nanodelcev, ki smo jo pred tem 30 minut sonicirali in jo razredčili v mediju, tako da smo dobili nanodelce v različnih koncentracijah. Naredili smo tudi negativno kontrolo s 50 µL medija ter pozitivno kontrolo s 50 µL 30-µM propranolola. V vsako vdolbinico smo dodali tudi 50 µL s fluorescentnim barvilom označenih fosfolipidov LipidTOX. Pri vsakem tretmaju smo pustili eno vdolbinico brez barvila in namesto tega dodali 50 µL medija. Tretirane celice oziroma kontrole so bile inkubirane pri 37 °C 12, 24 in 48 ur. Celice, tretirane z nano-CuO v koncentracijah 1, 2 in 5 µg/mL, so bile posebej inkubirane tudi 72 ur in 7 dni.

Koncentracije nanodelcev, uporabljene pri pripravi vzorcev za vrednotenje tvorbe lamelarnih telesc v celicah s pretočno citometrijo, so prikazane v preglednici 3. Najprej smo uporabili nano-CuO v koncentracijah 5 in 10 µg/mL. Ko smo ugotovili, da pri nano-CuO v koncentraciji 10 µg/mL veliko celic odmre pred meritvami, smo daljši čas (27 ur in 7 dni) tretirali celice še z nano-CuO v nižjih koncentracijah (1, 2, 5 µg/mL).

Pri 12-, 24- in 28-urni izpostavitvi se je število ponovitev za posamezen tretma razlikovalo glede na tretma. Izmerili smo 14 vzorcev negativne kontrole, po 7 vzorcev celic pozitivne kontrole (tretirane s 30-µM propranololom) in celic, tretiranih z nano-SiO₂ v različnih koncentracijah ter po 3 vzorce celic, tretiranih z nano-CuO v različnih koncentracijah. Pri 72-urni izpostavljenosti celic smo naredili po 3 ponovitve za vsak posamezen tretma. Pri 7-dnevni izpostavljenosti pa smo naedili po 4 ponovitve za vsak posamezen tretma.

Preglednica 3: Koncentracije nano-SiO₂ in nano-CuO, uporabljene pri pripravi vzorcev za meritve fluorescence celic s pomočjo pretočne citometrije

Vrsta nanodelcev	Uporabljene koncentracije [µg/mL]
nano-CuO	5 in 10 (tretirano 12, 24 in 48 ur)
	1, 2 in 5 (tretirano 72 ur in 7 dni)
nano-SiO ₂	1, 5, 10, 50 in 100

3.6.2 Merjenje intenzivnosti fluorescence celic na pretočnem citometru

Intenzivnost fluorescence celic smo merili v laboratoriju za klinično biofiziko na Ortopedski kliniki v Ljubljani.

Po tretiranju celic smo odstranili medij, celice sprali s 50 µL pufru PBS in jih 10–20 minut tripsinizirali s 40 µL tripsina TripleSelect. Po tripsinizaciji smo celice sprali z dna vdolbinic s 100 µL medija in jih skupaj z medijem dali v mikro centrifugirke, v katerih smo jih 7 minut centrifugirali na 250 rcf. Po tem smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v 200 µL pufru PBS. Intenzivnost fluorescence celic smo izmerili pri

valovni dolžini 525/50 nm, z ekscitacijo pri valovni dolžini 488 nm, na pretočnem citometru MACSQuant (MACS Miltenyl Biotec).

3.7 ANALIZA PODATKOV

3.7.1 Analiza rezultatov testa MTT in testa privzema barvila NR

Za analizo podatkov testa MTT in testa privzema barvila NR smo uporabili programsko opremo MS Office excel.

Najprej smo za nanodelce vsake koncentracije in vsake kontrole izračunali povprečno vrednost absorbance, izmerjene na vsebini vdolbinic, kjer ni bilo celic, ampak le medij in nanodelci. Te vrednosti smo potem odšteli od vrednosti absorbance, izmerjenih na vsebini vdolbinic s celicami za ustrezen tretma. Izračunali smo povprečja in standardne deviacije (SD) meritev absorbance za nanodelce posamezne koncentracije oziroma kontrol. Naredili smo tudi studentov t-test za primerjavo med meritvami negativne kontrole in ostalih tretmajev, kjer nas je zanimala vrednost *p*. Če je bila ta manjša od 0,05, smo rezultat šteli za statistično značilno različen.

3.7.2 Analiza rezultatov, dobljenih z uporabo pretočnega citometra

Za analizo podatkov, pridobljenih z uporabo pretočnega citometra, smo uporabili programsko opremo MACSQuant, FCS Express in MS Office excel.

Pri meritvi enega vzorca (ene biološke ponovitve) na pretočnem citometru smo dobili izračunano povprečno vrednost intenzivnosti fluorescence za okoli $500 - 10^4$ celic. To vrednost smo uporabljali za naslednje izračune. Od povprečja meritev intenzivnosti fluorescence obarvanih celic določenega tretmaja (izračunanega iz povprečij posameznih vzorcev) smo odšteli povprečje meritev intenzivnosti fluorescence neobarvanih celic (iz vdolbinice, kjer nismo dodali barvila) ustreznega tretmaja. Izračunali smo tudi SD in naredili studentov t-test za primerjavo intenzivnosti fluorescence pri kontrolnih celicah in pri celicah, tretiranih z nanodelci v različnih koncentracijah oziroma 30- μ M propranololom.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI TESTOV CITOTOKSIČNOSTI

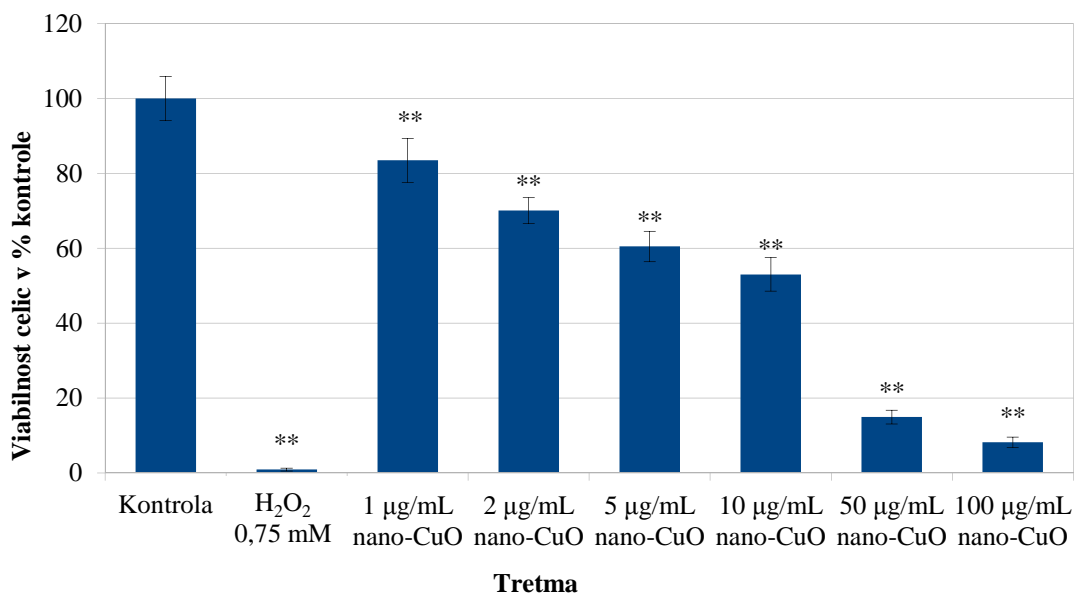
4.1.1 Citotoksičnost, izzvana z nanodelci CuO

Citotoksičnost nano-CuO oziroma njihov vpliv na metabolizem celic smo ugotavljali s spektrofotometričnim merjenjem absorbance posameznih vzorcev. Rezultate teh testov za nano-CuO prikazujemo na sliki 2 (test MTT) in sliki 3 (test privzema barvila NR). Pri rezultatih obeh testov je razlika med viabilnostjo celic pri negativni in pozitivni kontroli (0,75 mM H₂O₂) velika.

4.1.1.1 Rezultati, pridobljeni s testom MTT

Pri rezultatih testa MTT (sl. 2) lahko opazimo, da z večanjem koncentracije nanodelcev povprečna viabilnost oziroma metabolizem celic pada. Že pri nano-CuO koncentracije 1 µg/mL je povprečna viabilnost celic zmanjšana pod 90 % viabilnosti kontrole, pri koncentraciji 2 µg/mL pa je viabilnost padla na približno 70 % viabilnosti kontrole. Nano-CuO v koncentracijah 50 in 100 µg/mL že močno zmanjšajo metabolizem celic (pod 20 % viabilnosti kontrole).

Primerjava meritev citotoksičnosti pri posameznih koncentracijah nanodelcev in pri negativni kontroli je pokazala statistično značilno razliko pri vseh koncentracijah nano-CuO ($p < 0,01$).

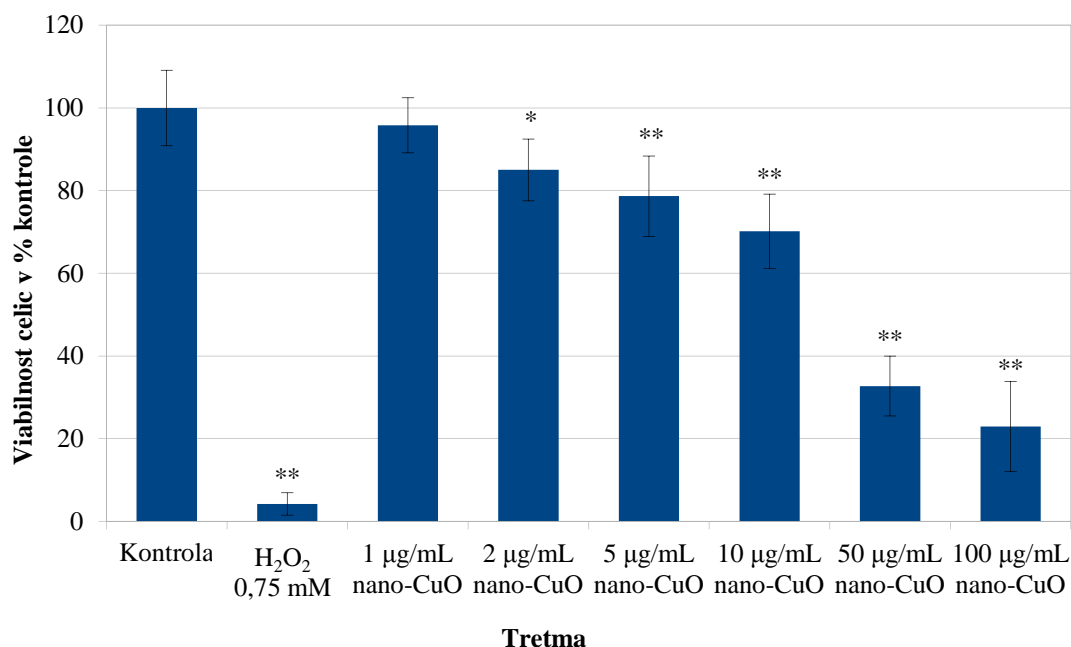


Slika 2: Rezultati testa MTT – povprečna viabilnost celic v odstotkih viabilnosti pri kontroli (kontrola je 100 %) pri 24-urnem tretiranju z nanodelci CuO (nano-CuO) v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75-mM vodikov peroksid - H₂O₂) kontroli. Prikazana je primerjava med viabilnostjo kontrolnih celic in viabilnostjo posameznih tretmajev ($\bar{x} \pm SD$, n = 8; ***p* < 0,01)

4.1.1.2 Rezultati, pridobljeni s testom privzema barvila NR

Tudi rezultati testa privzema barvila NR (sl. 3) so pokazali, da z večanjem koncentracije nanodelcev povprečna viabilnost celic pada. Nano-CuO koncentracije 5 µg/mL povzročijo zmanjšanje viabilnosti celic pod 80 % viabilnosti kontrole. Nanodelci v koncentracijah 50 in 100 µg/mL pa zmanjšajo metabolizem celic pod 40 % viabilnosti celic negativne kontrole.

Pri rezultatih testa privzema barvila NR je statistično značilna razlika opazna pri vseh koncentracijah nanodelcev, razen pri koncentraciji 1 µg/mL, kjer vrednost *p* ni manjša od 0,05 (sl. 3).



Slika 3: Rezultati testa privzema barvila NR – povprečna viabilnost celic v odstotkih kontrole (kontrola je 100 %) pri 24-urnem tretiranju z različnimi koncentracijami nano-CuO oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75-mM vodikov peroksid - H₂O₂) kontroli. Prikazana je primerjava med viabilnostjo kontrolnih celic in viabilnostjo posameznih tretmajev ($\bar{x} \pm SD$, n = 8; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$)

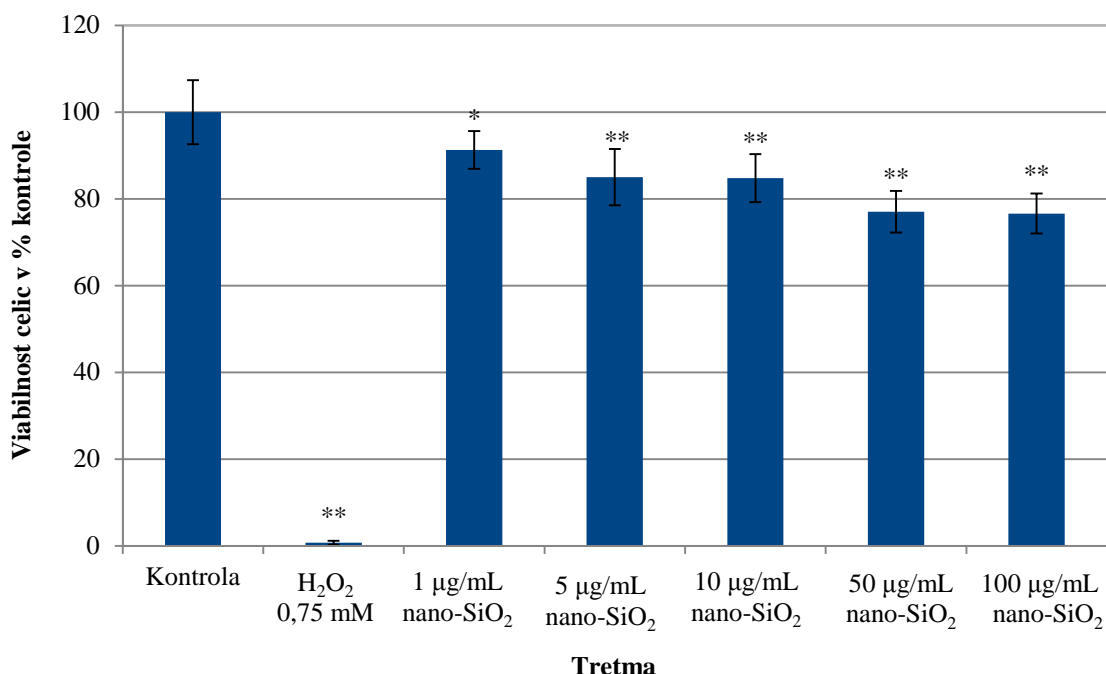
4.1.2 Citotoksičnost, izzvana z nanodelci SiO₂

Citotoksičnost nano-SiO₂ oziroma njihov vpliv na metabolizem celic smo ugotavljali s spektrofotometričnim merjenjem absorbance posameznih vzorcev. Rezultati teh testov za nano-SiO₂ so prikazani na sliki 4 (test MTT) in sliki 5 (test privzema barvila NR). Za vsak posamezen tretma smo naredili 8 ponovitev. Pri rezultatih obeh testov je razlika med viabilnostjo celic pri negativni in pozitivni kontroli (0,75 mM H₂O₂) velika.

4.1.2.1 Rezultati, pridobljeni s testom MTT

Pri rezultatih testa MTT (sl. 4) lahko opazimo, da pri tretiranju z nano-SiO₂ z večanjem koncentracije povprečna viabilnost oziroma metabolizem celic pada, vendar je tudi pri najvišji koncentraciji malo nad 70 % viabilnosti kontrole. Nano-SiO₂ koncentracije 50 µg/mL povzroči zmanjšanje viabilnosti celic pod 80 % viabilnosti kontrolnih celic.

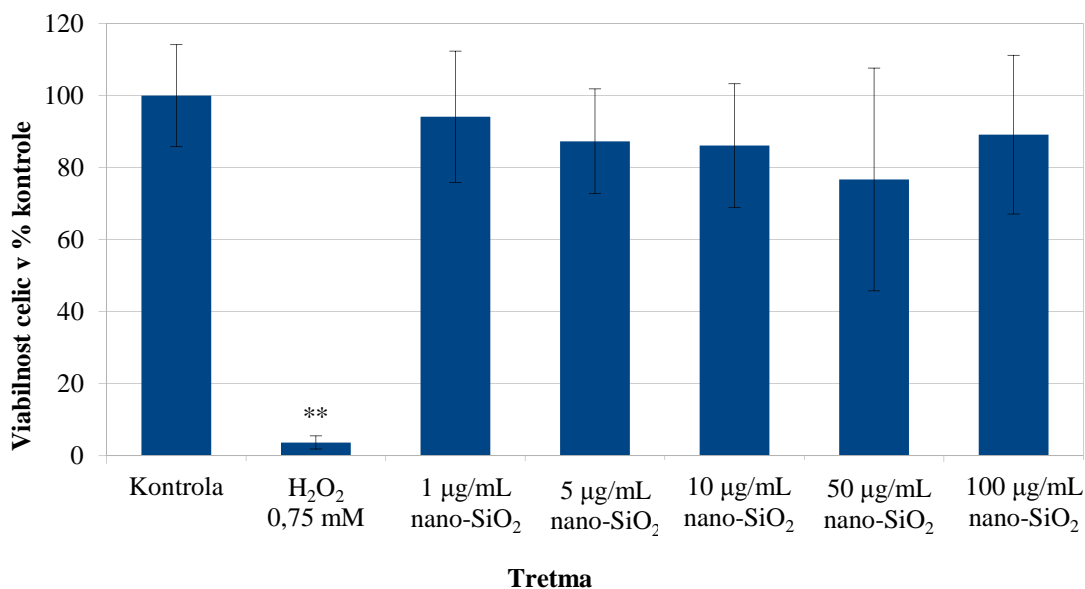
Pri rezultatih testa MTT je razlika med izmerjeno citotoksičnostjo nano-SiO₂ pri vseh koncentracijah in citotoksičnostjo pri negativni kontroli statistično značilna ($p < 0,01$ pri vseh koncentracijah nano-SiO₂, razen pri koncentraciji 1 µg/mL, kjer je $p < 0,05$) (sl. 4).



Slika 4: Rezultati testa MTT – povprečna viabilnost celic v odstotkih kontrole (kontrola je 100 %) pri 24-urnem tretiranju z nanodelci SiO₂ (nano-SiO₂) v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75-mM vodikov peroksid - H₂O₂) kontroli. Prikazana je primerjava med viabilnostjo kontrolnih celic in viabilnostjo posameznih tretmajev ($\bar{x} \pm SD$, n = 8; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.1.2.2 Rezultati, pridobljeni z testom privzema barvila NR

Rezultati testa privzema barvila NR (sl. 5) so pokazali, da pri tretiranju z nano-SiO₂ z večanjem koncentracije ni statistično značilnega padanja viabilnosti oziroma metabolizma celic. Vendar pa smo opazili, da nano-SiO₂ vežejo bavilo NR ter zato interferirajo z meritvami, kar pomeni, da meritve niso zanesljive. Opazna je tudi velika razpršenost rezultatov posameznih meritev pri določenem tretmaju (visoke vrednosti SD). Pri rezultatih testa privzema barvila NR statistično značilnih razlik ni.

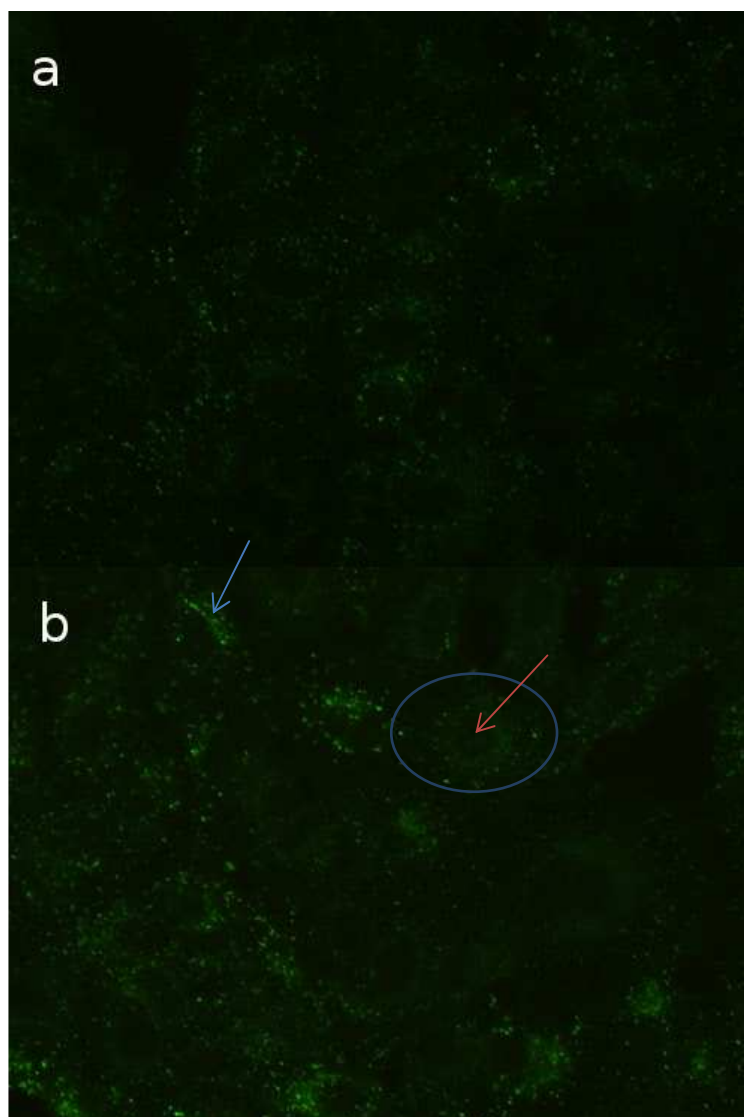


Slika 5: Rezultati testa privzema barvila NR – povprečna viabilnost celic v odstotkih kontrole (kontrola je 100 %) pri 24-urnem tretiranju z različnimi koncentracijami nano-SiO₂ oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75-mM vodikov peroksid - H₂O₂) kontroli. Prikazana je primerjava med viabilnostjo kontrolnih celic in viabilnostjo posameznih tretmajev ($\bar{x} \pm SD$, n = 8; ** $p < 0,01$)

4.2 REZULTATI PREGLEDA FLUORESCENTNO OBARVANIH PREPARATOV Z EPIFLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM

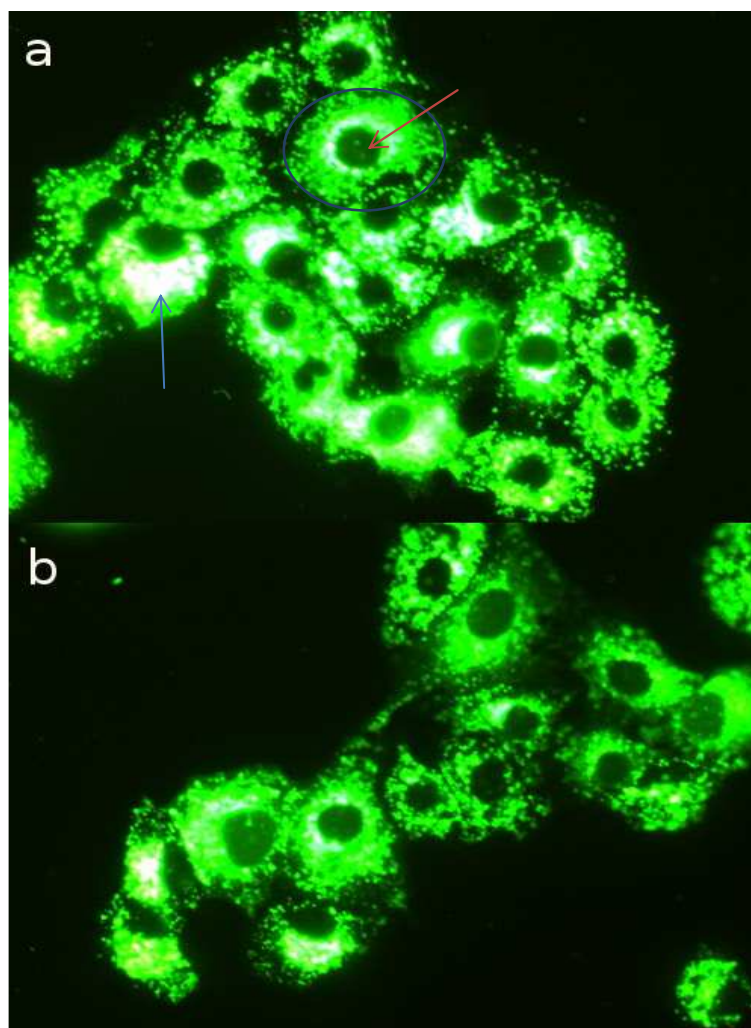
S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo opredelili količino fosfolipidov in s tem lamelarnih telesc v celicah, obarvanih s fluorescentnim barvilom LipidTOX. Na sliki 6 so prikazane kontrolne celice, na sliki 7 pa celice, ki so bile izpostavljene 30- μ M propranololu in predstavljajo pozitivno kontrolo.

Na preparatu z obarvanimi kontrolnimi celicami (negativna kontrola) lahko opazimo obarvane strukture v notranjosti celic (sl. 6).



Slika 6: Posnetek celic negativne kontrole pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom. Celice so bile 48 ur inkubirane v celičnem mediju in obarvane z barvilom LipidTOX. a, b: različna posnetka celic istega vzorca; modra puščica označuje intenzivneje obarvane fosfolipidne strukture v celici; obkrožena je ena izmed celic na preparatu, rdeča puščica označuje neobarvano jedro.

Na preparatu s celicami pozitivne kontrole (30- μ M propranolol) (sl. 7) je v primerjavi z negativno kontrolo (sl. 6) opazno izredno veliko povečanje količine fluorescentno obarvanih struktur v celicah.



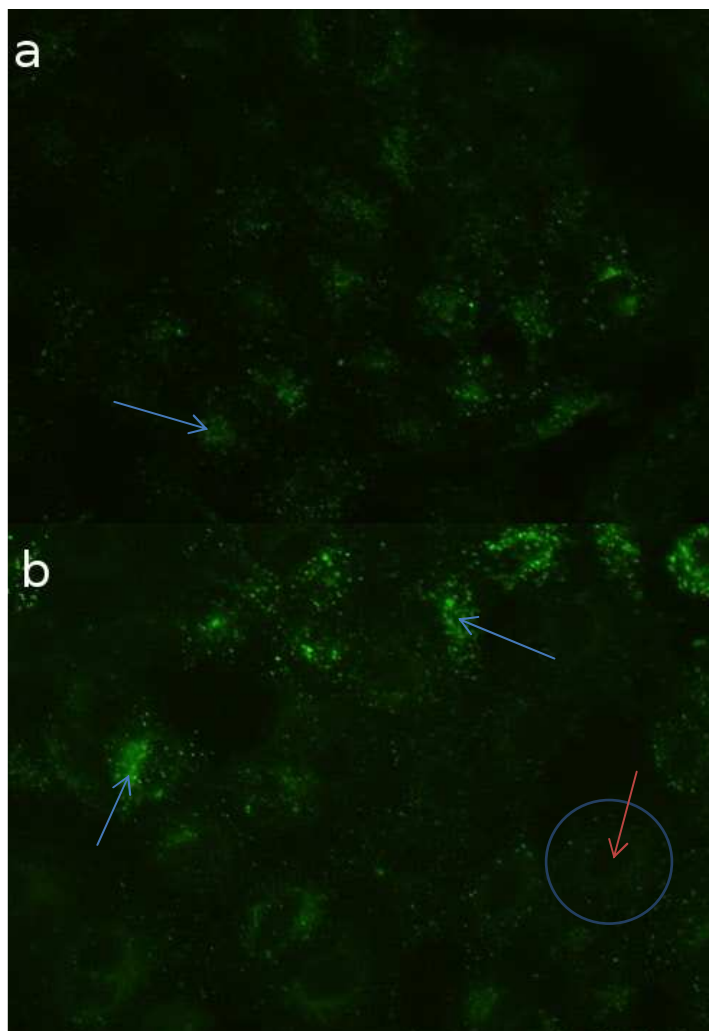
Slika 7: Posnetek celic pozitivne kontrole pri 400-kratni povečavi in enaki osvetlitvi kot celice negativne kontrole z epifluorescenčnim mikroskopom. Celice so bile 48 ur izpostavljene 30- μ M propranololu in obarvane z barvilom LipidTOX. a, b: različna posnetka celic istega vzorca; modra puščica označuje intenzivneje obarvane fosfolipidne strukture v celici; obkrožena je ena izmed celic na preparatu, rdeča puščica označuje neobarvano jedro.

4.2.1 Količine fosfolipidov v celicah, tretiranih z nanodelci CuO

Na spodnjih slikah so prikazane celice, ki so bile 48 ur tretirane z nano-CuO v različnih koncentracijah. Slika 8 prikazuje celice, tretirane z nano-CuO v koncentraciji 2 μ g/mL, slika 9 prikazuje celice, tretirane z nano-CuO v koncentraciji 5 μ g/mL, slika 10 pa prikazuje celice, tretirane z nano-CuO v koncentraciji 10 μ g/mL.

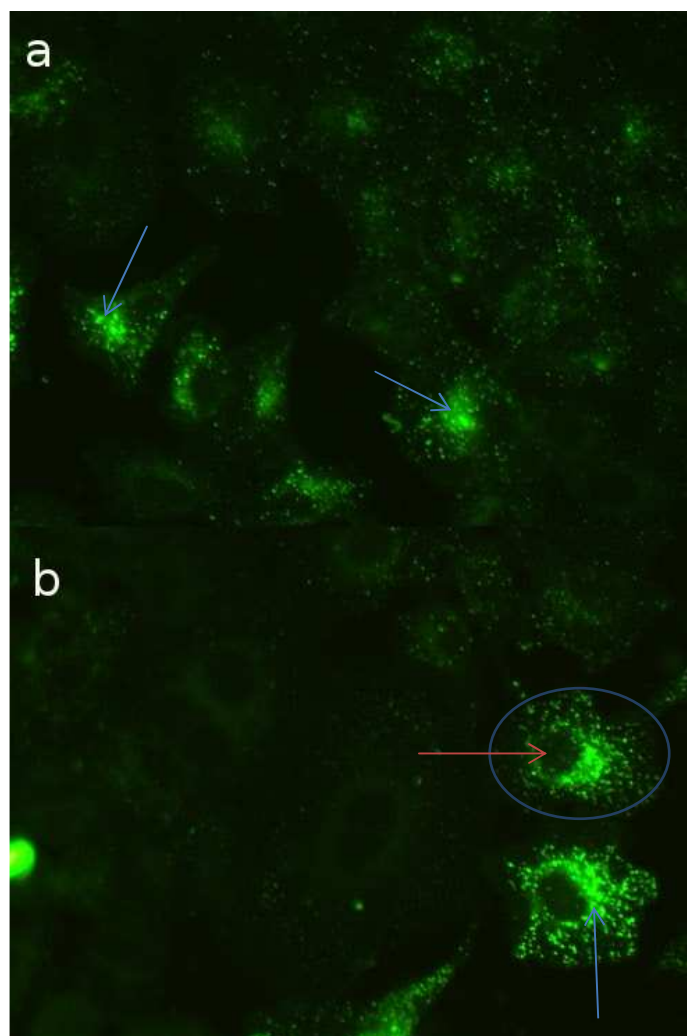
Na preparatu s celicami, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-CuO v koncentraciji 2 μ g/mL (sl. 8), je opaziti malo močnejšo fluorescenco kot pri negativni kontroli (sl. 6) in bistveno

šibkejšo kot pri pozitivni kontroli (sl. 7). Opazili smo tudi, da je pri nekaterih celicah obarvanje večje kot pri drugih.



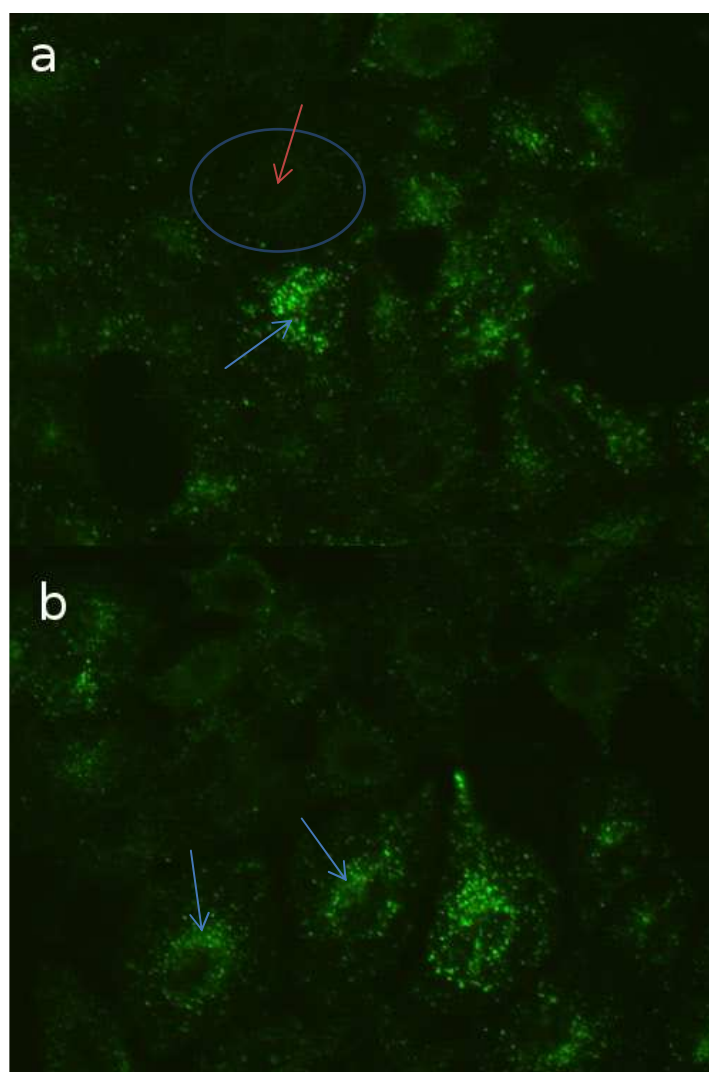
Slika 8: Posnetek celic pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom. Celice so bile 48 ur izpostavljene nano-CuO v koncentraciji 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in obarvane z barvilom LipidTOX. a, b: različna posnetka celic istega vzorca; modre puščice označujejo intenzivneje obarvane fosfolipidne strukture v celici; obkrožena je ena izmed celic na preparatu, rdeča puščica označuje neobarvano jedro.

Na preparatu s celicami, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-CuO v koncentraciji 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sl. 9) je opazna močnejša fluorescenca kot pri preparatu z negativno kontrolo (sl. 6) in nano-CuO v nižji koncentraciji (sl. 8) ter šibkejša kot pri pozitivni kontroli (sl. 7). Tudi pri teh preparatih smo opazili, da je pri nekaterih celicah obarvanje večje kot pri drugih, kar je posebej opazno na sliki 9b.



Slika 9: Posnetek celic pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom. Celice so bile 48 ur izpostavljene nano-CuO v koncentraciji 5 $\mu\text{g/mL}$ in obarvane z barvilom LipidTOX. a, b: različna posnetka celic istega vzorca; modre puščice označujejo intenzivneje obarvane fosfolipidne strukture v celici; obkrožena je ena izmed celic na preparatu, rdeča puščica označuje neobarvano jedro.

Na preparatu s celicami, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-CuO v koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ (sl. 10) lahko vidimo več fluorescentno obarvanih struktur kot pri negativni kontroli (sl. 6) in pri istih nanodelcih nano-CuO v nižjih koncentracijah (sl. 8 in sl. 9). Prav tako je fluorescenca šibkejša kot pri preparatu s pozitivno kontrolo (celice, tretirane s propranololom) (sl. 7). Ponovno pa smo na preparatu opazili neenakomerno obarvanje celic.



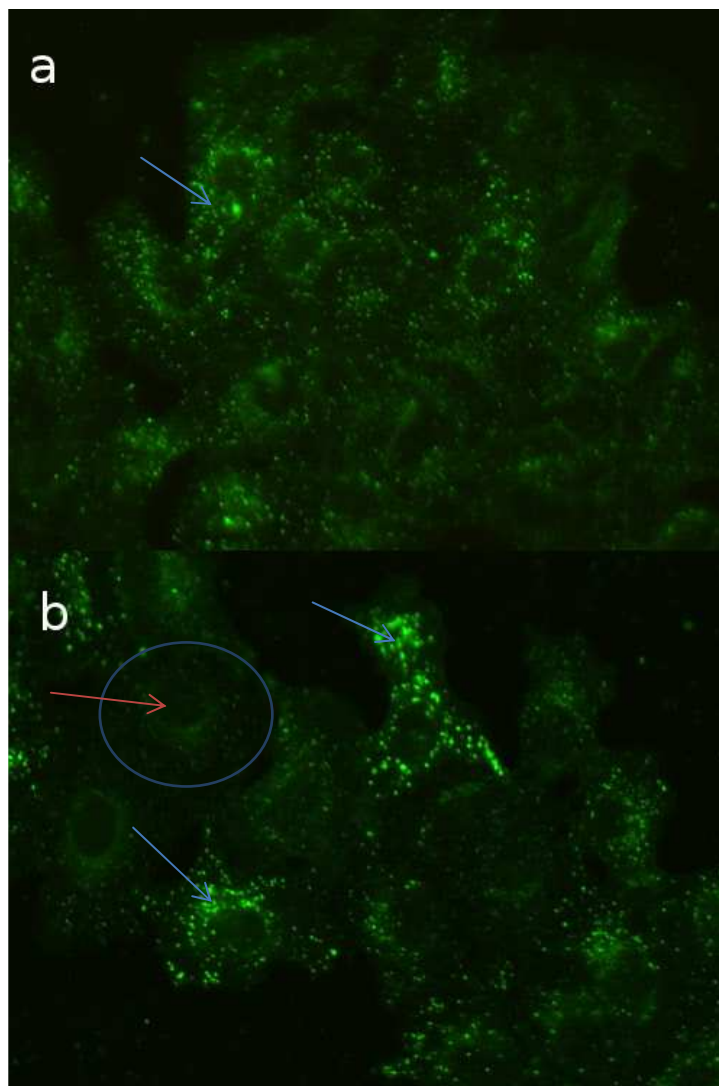
Slika 10: Posnetek celic pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom. Celice so bile 48 ur izpostavljene nano-CuO v koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ in obarvane z barvilom LipidTOX. a, b: različna posnetka celic istega vzorca; modre puščice označujejo intenzivneje obarvane fosfolipidne strukture v celici; obkrožena je ena izmed celic na preparatu, rdeča puščica označuje neobarvano jedro.

4.2.2 Količine fosfolipidov v celicah, tretiranih z nanodelci SiO₂

Slika 11 predstavlja celice, tretirane z nano-SiO₂ v koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$, slika 12 pa celice, tretirane z nano-SiO₂ v koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$. Celice so bile nanodelcem izpostavljene 48 ur.

Na preparatu s celicami, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-SiO₂ v koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ (sl. 11), vidimo, da je fluorescenca celic močnejša kot pri preparatu s kontrolnimi celicami

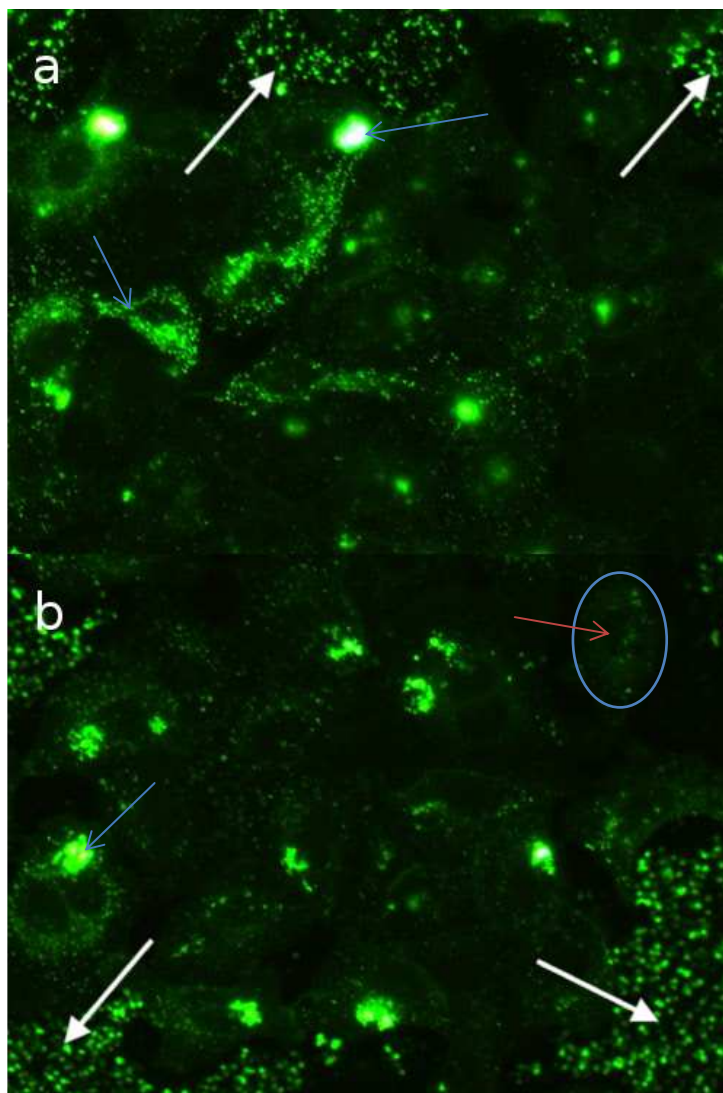
(sl. 6), vendar so opazne fluorescentno obarvane strukture tudi na površini celic in ne le v notranjosti. Zato gre morda za aterfakt, ki ga povzročajo nano-SiO₂. Fluorescenca je ponovno šibkejša kot na preparatu s pozitivno kontrolo (sl. 7).



Slika 11: Posnetek celic pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom. Celice so bile 48 ur izpostavljene nano-SiO₂ v koncentraciji 10 µg/mL in obarvane z barvilom LipidTOX. a, b: različna posnetka celic istega vzorca; modre puščice označujejo intenzivne obarvane fosfolipidne strukture v celici; obkrožena je ena izmed celic na preparatu, rdeča puščica označuje neobarvano jedro.

Na preparatu s celicami, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-SiO₂ v koncentraciji 50 µg/mL (sl. 12), vidimo, da je fluorescenca celic močnejša kot pri preparatu s kontrolnimi celicami (sl. 6) in šibkejša kot pri preparatu s pozitivno kontrolo (sl. 7). Opazimo lahko, da so na

površini celic nabrani obarvani skupki, močno je obarvana tudi okolica celic, kjer so samo nanodelci (sl. 12, označeno z belimi puščicami), kar pomeni, da se fluorescentno barvilo LipidTOX veže tudi na same nano-SiO₂.



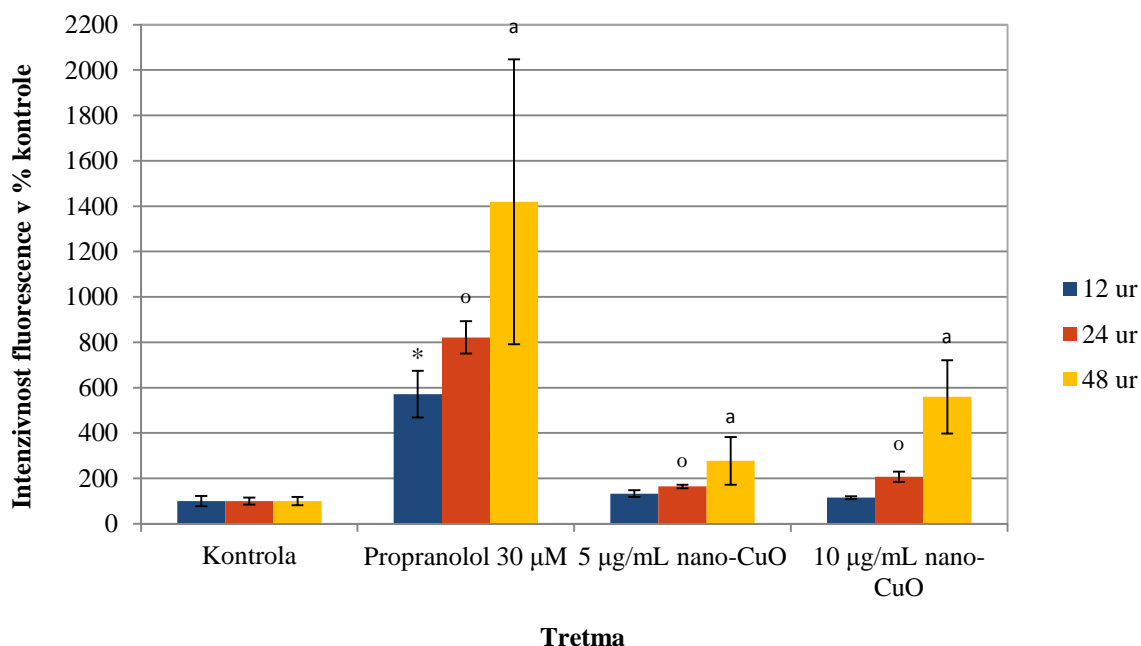
Slika 12: Posnetek celic pri 400-kratni povečavi z epifluorescenčnim mikroskopom. Celice so bile 48 ur izpostavljene nano-SiO₂ v koncentraciji 50 µg/mL in obarvane z barvilom LipidTOX. a, b: različna posnetka celic istega vzorca; modre puščice označujejo intenzivneje obarvane fosfolipidne strukture v celici; bele puščice označujejo predele, kjer so samo nano-SiO₂; obkrožena je ena izmed celic na preparatu, rdeča puščica označuje neobarvano jedro.

4.3 REZULTATI MERITEV INTENZIVNOSTI FLUORESCENCE NA PRETOČNEM CITOMETRU

Na slikah 13, 14 in 15 so prikazane povprečne vrednosti intenzivnosti fluorescence pri merjenju na pretočnem citometru, in sicer za celice, tretirane z nano-CuO (sl. 13 in sl. 14) in nano-SiO₂ (sl. 15) v različnih koncentracijah. Celice so bile tretmajem izpostavljene 12, 24 in 48 ur (sl. 13 in sl. 15) oziroma 72 ur in 7 dni (sl. 14). Vrednosti fluorescence so prikazane glede na vrednost fluorescence pri negativni kontroli (pri kontroli so vrednosti fluorescence 100 %).

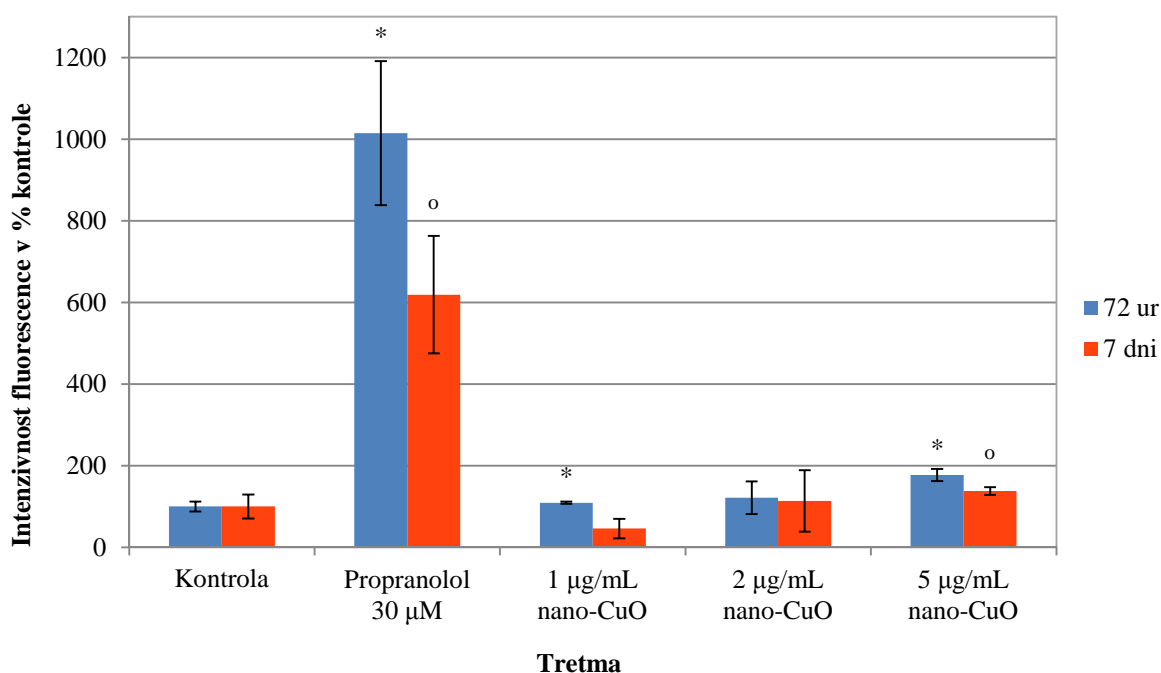
Opazimo lahko, da je pri vseh enakih časovnih izpostavljenostih celic različnim tretmajem izmerjena velika razlika v povprečni intenzivnosti fluorescence med celicami negativne kontrole in celicami, izpostavljenimi 30- μ M propranololu (pozitivna kontrola).

Na sliki 13 lahko opazimo, da pri povprečnih vrednostih fluorescence celic pri 12-urnem tretiranju z nano-CuO koncentracijska odvisnost ni opazna in tudi ni statistično značilno različna od povprečne intenzivnosti fluorescence pozitivne kontrole. Pri 24-urni in pri 48-urni izpostavljenosti je povprečna intenzivnost fluorescence celic večja kot pri povprečni fluorescenci kontrolnih celic in tudi statistično značilno različna ter z višanjem koncentracije raste.



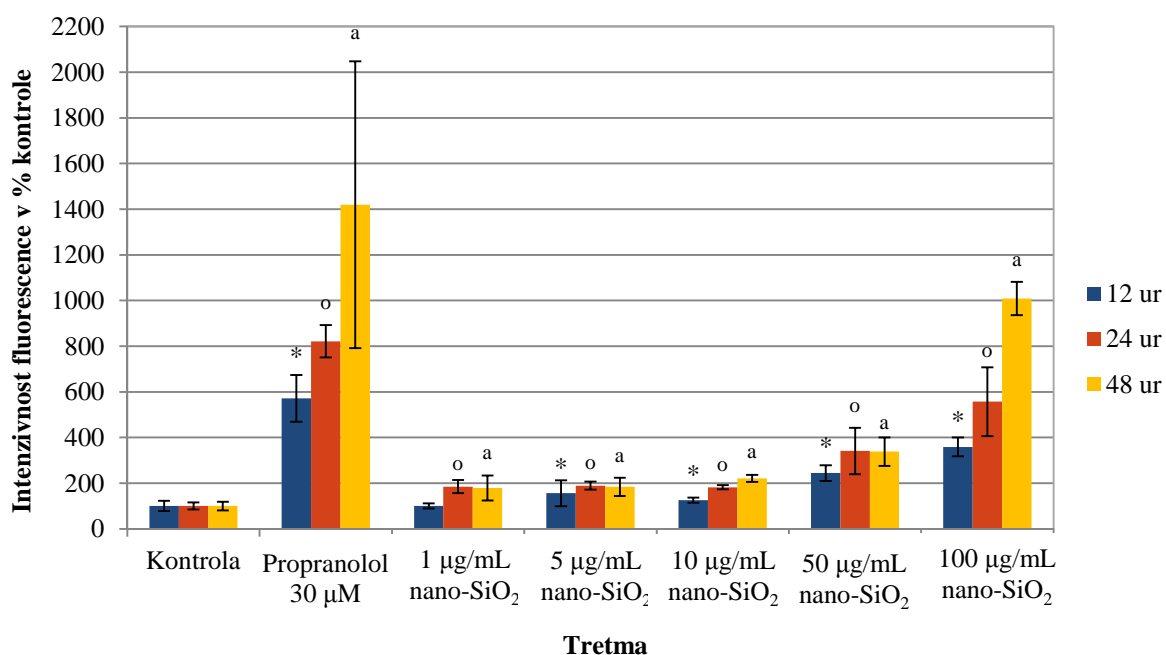
Slika 13: Rezultati meritev na pretočnem citometru – povprečna intenzivnost fluorescence celic v odstotkih intenzivnosti fluorescence pri kontroli (kontrola je 100 %) pri tretiranju z nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (30-µM propranolol) kontroli. Celice so bile tretmajem izpostavljene 12, 24 in 48 ur. Intenzivnost fluorescence celic, izpostavljenih enako časa nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma 30-µM propranololu, je primerjana z intenzivnostjo fluorescence celic, ustrezno časovno izpostavljenih samo mediju (kontrola). $\bar{x} \pm SD$, število bioloških ponovitev za kontrolne celice je 14, za celice pozitivne kontrole 7, za celice, tretirane z nano-CuO, pa 3; * $p < 0,05$ za 12 ur izpostavljene celice, ^o $p < 0,05$ za 24 ur izpostavljene celice, ^a $p < 0,05$ za 48 ur izpostavljene celice).

Na sliki 14 so prikazane povprečne vrednosti intenzivnosti fluorescence pri merjenju na pretočnem citometru za celice, tretirane z nano-CuO, ki so bile tretmajem izpostavljene 72 ur in 7 dni. Pri 72-urni in 7-dnevni izpostavljenosti nano-CuO je opazna rast povprečne vrednosti fluorescence celic v odvisnosti od koncentracije nanodelcev. Statistično značilna razlika za 72 ur tretirane celice je prisotna pri nano-CuO v koncentracijah 1 in 5 µg/mL. Statistično značilna razlika za 7 dni tretirane celice se pojavi pri nano-CuO v koncentraciji 5 µg/mL.



Slika 14: Rezultati meritev na pretočnem citometru – povprečna intenzivnost fluorescence celic v odstotkih intenzivnosti fluorescence kontrole (kontrola je 100 %) pri tretiranju z nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (30-µM propranolol) kontroli. Celice so bile tretmajem izpostavljene 72 ur in 7 dni. Intenzivnost fluorescence celic, izpostavljenih enako časa nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma 30-µM propranololu, je primerjana z intenzivnostjo fluorescence celic, ustrezno časovno izpostavljenih samo mediju (kontrola). $\bar{x} \pm SD$, število bioloških ponovitev za vse celice, ki so bile tretmajem izpostavljene 72 ur, je 3, za celice, izpostavljene 7 dni, pa 4; * $p < 0,05$ za 72 ur izpostavljene celice, ^o $p < 0,05$ za 7 dni izpostavljene celice.

Na sliki 15 je videti, da intenzivnost fluorescence z višanjem koncentracije nano-SiO₂ in podaljševanjem časa tretiranja narašča. Pri pregledu preparatov celic, izpostavljenih nano-SiO₂, pa smo s fluorescenčnim mikroskopom ugotovili, da je to posledica vezave barvila LipidTOX na nano-SiO₂ (sl. 12).



Slika 15: Prikaz rezultatov meritev na pretočnem citometru – povprečna intenzivnost fluorescence celic v odstotkih intenzivnosti fluorescence kontrole (kontrola je 100 %) pri tretiranju z nano-SiO₂ v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (30-µM propranolol) kontroli. Celice so bile tretmajem izpostavljene 12, 24 in 48 ur. Intenzivnost fluorescence celic, izpostavljenih enako časa nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma 30-µM propranololu, je primerjana z intenzivnostjo fluorescence celic, ustrezno časovno izpostavljenih samo mediju (kontrola). $\bar{x} \pm SD$, število bioloških ponovitev za kontrolne celice je 14, za celice pozitivne kontrole in celice, tretirane z nano-CuO, pa 7; * $p < 0,05$ za 12 ur izpostavljene celice, ^o $p < 0,05$ za 24 ur izpostavljene celice, ^a $p < 0,05$ za 48 ur izpostavljene celice.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV NANODELCEV NA METABOLIZEM CELIC

S testi citotoksičnosti smo želeli določiti koncentracije nanodelcev, ki pri človeških pljučnih celicah A549 še ne povzročajo opaznejših učinkov na metabolizem celic.

Ob primerjavi uporabljenih metod citotoksičnosti (test MTT in privzem barvila NR) lahko opazimo, da rezultati testa privzema barvila NR pokažejo manjšo citotoksičnost oziroma manjše zmanjšanje metabolizma celic pri tretiranju z nano-CuO kot test MTT. Pri testu privzema barvila NR je viabilnost celic zmanjšana na 80 % viabilnosti kontrolnih celic pri tretmaju nano-CuO v koncentraciji 5 $\mu\text{g/mL}$ (sl. 3), pri testu MTT pa že pri nano-CuO v koncentraciji 2 $\mu\text{g/mL}$ (sl. 2).

Ti rezultati so delno podobni rezultatom, ki so jih dobili Ahamed in sodelavci (2010) v svoji raziskavi, kjer so med drugim preiskovali citotoksičnost nano-CuO pri celicah A549. Ugotovili so, da je test privzema barvila NR v povprečju pokazal malo manjšo citotoksičnost kot test MTT. V obeh primerih pa je bila citotoksičnost posameznih koncentracij nano-CuO pri njihovih rezultatih manjša kot pri naših rezultatih.

Sklepamo torej, da nano-CuO, ob 24-urni izpostavljenosti celic A549 tem delcem, zmanjšajo metabolizem celic A549.

Rezultati citotoksičnosti nano-SiO₂ so pri obeh metodah za določanje citotoksičnosti dokaj podobni, saj pri obeh pade viabilnost celic pod 80 % glede na kontrolne celice šele pri tretiranju z nano-SiO₂ v koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ (sl. 4 in sl. 5). Nano-SiO₂ imajo torej veliko manjši vpliv na metabolizem celic A549 kot nano-CuO. Poleg tega lahko opazimo, da je pri testu privzema barvila NR razpršenost rezultatov zelo velika (visoke vrednosti SD) (sl. 5), kar je najverjetneje posledica interakcije nanodelcev z barvilom. Potrdili smo, da sama suspenzija nano-SiO₂ brez celic in obarvana z barvilom NR doprinese k izmerjenim vrednostim absorbance (priloga D). To pomeni, da test privzema barvila NR ni najprimernejša metoda za določanje citotoksičnosti nano-SiO₂.

Podobne rezultate, kot so naši, so dobili tudi Lin in sodelavci (2006), ki so (sicer z drugimi metodami) preiskovali citotoksičnost nano-SiO₂ pri celicah A549. Ugotovili so, da viabilnost celic z višanjem koncentracije nano-SiO₂ zelo počasi pada, in zaključili, da nano-SiO₂ nimajo znatnega učinka na celice.

5.2 TVORBA LAMELARNIH TELESC

Tvorbo lamelarnih telesc oziroma količino fosfolipidov v celicah smo vrednotili s fluorescentnim barvanjem celic A549. Intenzivnost fluorescence celic smo izmerili s pomočjo pretočnega citometra, poleg tega pa smo pregledali preparate obarvanih celic tudi z epifluorescenčnim mikroskopom.

Pri pregledu preparatov celic, obarvanih s fluorescentnim barvilom LipidTOX, smo z epifluorescenčnim mikroskopom opazili zelo šibko fluorescenco pri kontrolnih celicah in zelo močno fluorescenco pri celicah, tretiranih s 30- μ M propranololom, ki predstavljajo pozitivno kontrolo. Enako smo opazili tudi pri rezultatih meritev s pretočnim citometrom, kar pomeni, da je uporabljena metoda, ki sicer še ni splošno razširjena, uporabna za dokazovanje količine fosfolipidov v celicah. Ti rezultati se ujemajo z rezultati raziskave Shahane in sodelavcev (2013) ter Park in sodelavcev (2012), v kateri so prvi z uporabo rdečega barvila LipidTOX in drugi z uporabo rdečega in zelenega barvila LipidTOX ugotovili, da propranolol povzroča fosfolipidozo v celicah HepG2.

Pri uporabi metode fluorescentnega barvanja pa je pomembno, da kombiniramo metode za vizualizacijo (mikroskopija) in metode za kvantifikacijo (pretočna citometrija), zato da se prepričamo, da pri kateri izmed metod ni prišlo do pozitivnega rezultata zaradi artefaktov.

Pri pregledu preparatov z epifluorescenčnim mikroskopom smo opazili, da je fluorescenca celic, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-CuO v treh različnih koncentracijah (1, 5 in 10 μ g/mL) (sl. 8–10), malo močnejša od fluorescence pri kontrolnih celicah (sl. 6). Tudi rezultati, dobljeni z uporabo pretočnega citometra, kažejo, da je povprečna intenzivnost fluorescence celic, ki so bile izpostavljene nano-CuO, večja od povprečne intenzivnosti fluorescence kontrolnih celic. Iz tega lahko sklepamo, da nano-CuO povzročajo povečano količino fosfolipidnih struktur (morda lamelarnih telesc) v celicah, ki je odvisna od koncentracije nano-CuO, ki so ji izpostavljene celice.

Zagotovo lahko rečemo, da je prišlo do povečanja količine fosfolipidov v celicah pri 48-dnevem tretiranju z nano-CuO v koncentraciji 10 μ g/mL, ker je tam povprečna intenzivnost fluorescence, izmerjena s pretočnim citometrom, veliko višja (skoraj 5-krat) kot pri kontrolnih celicah. Pri nanodelcih nižjih koncentracij pa ne moremo z gotovostjo trditi, da je prišlo do tovrstnih učinkov.

Ti rezultati se ujemajo z ugotovitvami raziskav, katerih rezultati so pokazali povišano vsebnost lamelarnih telesc v celicah A549, pri uporabi različnih nanomaterialov, kot so zlati nanodelci (Wang in Petersen, 2013) in ogljikove nanocevke (Simon-Deckers in sod, 2008).

Zanimivo je, da pri daljšem tretiranju celic z nano-CuO (72-urno in 7-dnevno tretiranje) fluorescenca celic ne raste oziroma se celo zmanjša v primerjavi z 48-urnim tretiranjem (npr. pri tretiranju z nano-CuO v koncentraciji 5 μ g/mL (sl. 13 in 14)). Mogoče je, da po določenem času tretiranja učinek povečanja količine fosfolipidov v celicah izzveni, morda

zato, ker si celice s pomočjo kakšnega obrambnega mehanizma opomorejo, kar bi se ujemalo s teorijo, ki pravi da je tvorba lamelarnih telesc in njihova ekskrecija način izločanja nanodelcev iz celic (Wang in Petersen, 2013; Ma in sod., 2011).

Ker je pri uporabljenih nano-CuO stopnja odtapljanja bakrovih ionov visoka (glej prilogo B), bi bila povečana vsebnost fosfolipidov lahko posledica delovanja bakrovih ionov. Zato bi bilo zanimivo preveriti, ali do zvišanja intenzivnosti fluorescence celic pride tudi pri izpostavitvi celic bakrovim ionom.

Primerjava parametrov citotoksičnosti in pojava fosfolipidnih struktur pokaže nekaj podobnosti. Ob 24-urnem tretiranju celic z nano-CuO koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ je citotoksičnost in vsebnost fosfolipidov malo višja kot pri enako dolgem tretiranju z nano-CuO v koncentraciji 5 $\mu\text{g/mL}$ (sl. 2–3 in sl. 13). Prav tako je razlika v citotoksičnosti in v vsebnosti fosfolipidnih struktur pri 72-urnem tretiranju v primerjavi s 24-urnim tretiranjem celic z nano-CuO v koncentraciji 5 $\mu\text{g/mL}$ zelo podobna.

Pri mikroskopskem pregledu preparatov celic, ki so bile 48 ur tretirane z nano-SiO₂ v koncentracijah 5 in 10 $\mu\text{g/mL}$, smo opazili povečano intenzivnost fluorescence, vendar smo pri teh preparatih opazili tudi, da zaradi vezave uporabljenega fluorescentnega barvila na te delce fluorescirajo tudi sami nano-SiO₂, kar je še posebej opazno na sliki 12. Rezultati meritev na pretočnem citometru kažejo, da celice, tretirane z nano-SiO₂ v naraščajočih koncentracijah s koncentracijo bolj fluorescirajo kot kontrolne celice. Glede na ugotovitev, da nano-SiO₂ vežejo uporabljeno barvilo, pa ti rezultati niso zanesljivi.

Zaključimo lahko, da nano-CuO povzročajo povečano količino fosfolipidnih struktur (morda lamelarnih telesc), kar potrjuje našo prvo hipotezo. Glede učinkov nano-SiO₂ ne moremo ničesar z gotovostjo trditi, saj ti delci vežejo uporabljeno fluorescentno barvilo in s tem motijo meritve, ki zato niso zanesljive.

Druge hipoteze ne moremo niti potrditi niti ovreči, ker zaradi nezanesljivih rezultatov pri tretiranju celic z nano-SiO₂ učinkov uporabljenih nanodelcev na povečano tvorbo lamelarnih telesc ne moremo primerjati. So pa rezultati testov citotoksičnosti pokazali, da so nano-CuO bolj citotoksični za celice A549 kot nano-SiO₂, kar bi lahko bila posledica delovanja bakrovih ionov, ki se odtapljajo z nano-CuO.

Ker se uporabljeno barvilo LipidTOX veže na različne fosfolipide, ne moremo z gotovostjo trditi, da so povečane intenzivnosti fluorescence res znak povečane količine lamelarnih telesc. Zato bi bilo za potrditev naših rezultatov potrebno preparate pregledati še s TEM in primerjati količino lamelarnih telesc pri kontrolnih celicah in celicah, izpostavljenih obojim nanodelcem v različnih koncentracijah. Poleg tega bi bilo smotrno preveriti tudi, ali se nanodelci zadržujejo v notranjosti lamelarnih telesc, o čemer so poročali nekateri raziskovalci (Singh in sod., 2007; Stearns in sod. 2011).

6 SKLEPI

- S pomočjo testa MTT in testa privzema barvila NR smo ugotovili, da dodatek nano-CuO vpliva na metabolizem človeških pljučnih celic A549, in sicer je vpliv odvisen od koncentracije nanodelcev, ki so ji izpostavljene celice. Učinek na celice se pozna že pri nano-CuO v najmanjši uporabljeni koncentraciji (1 µg/mL).
- Prav tako smo s pomočjo testa MTT in testa privzema barvila NR ugotovili, da imajo nano-SiO₂ vpliv na metabolizem celic A549, vendar pa je ta učinek manjši kot pri nano-CuO. Obenem smo ugotovili, da je test privzema barvila NR pri uporabi nano-SiO₂ nezanesljiv, ker se barvilo NR veže na te nanodelce.
- Pri pregledu preparatov z epifluorescenčnim mikroskopom in z meritvami na pretočnem citometru smo po pričakovanjih opazili zelo veliko razliko med intenzivnostjo fluorescence pri kontrolnih celicah in celicah, tretiranih s 30-µM propranololom, ki so predstavljale pozitivno kontrolo. Pri celicah pozitivne kontrole je bila intenzivnost fluorescence veliko višja kot pri celicah negativne kontrole.
- Z uporabo fluorescentnega barvanja celic A549 smo ugotovili, da nano-CuO povzročajo povečano vsebnost fosfolipidnih struktur in s tem lamelarnih telesc v celicah A549.
- Nano-SiO₂ zaradi vezave z uporabljenim fluorescentnim barvilom LipidTOX motijo meritve intenzivnosti fluorescence obarvanih celic na pretočnem citometru in zato uporabljena metoda sama po sebi ni najprimernejša za vrednotenje količine lamelarnih telesc v celicah, izpostavljenih nano-SiO₂.
- Za potrditev povečane količine lamelarnih telesc, in ne katerih drugih fosfolipidnih struktur v celici, bi bilo potrebno preparate pregledati še s transmisijskim elektronskim mikroskopom in primerjati količino lamelarnih telesc pri kontrolnih celicah in celicah, izpostavljenih obojim nanodelcem v različnih koncentracijah.

7 POVZETEK

Hiter razvoj nanotehnologij v zadnjih desetletjih pospešuje izdelavo in uporabo nanomaterialov za različne namene. Sočasno se povečuje tudi potreba po testiranju njihovih vplivov na žive organizme in njihove celice (Buzea in sod., 2007). Strupenostni vplivi nanomaterialov na celice so relativno dobro poznani. Slabše raziskani pa so vplivi nanomaterialov na celične odzive, ki jih običajno še ne opredelimo kot strupenost. Prav tako je tudi slabše raziskan vpliv različnih snovi na metabolizem lipidov in fosfolipidov v celicah. Med takšne učinke uvrščamo tudi sprožitev povečane tvorbe znotrajceličnih lamelarnih telesc (Anderson in Borlak, 2006).

Lamelarna telesca so znotrajcelične strukture - skupki fosfolipidov, ki običajno služijo shranjevanju lipidov v celicah (Schmitz in Müller, 1991). Povečano število lamelarnih telesc v celicah je morfološki znak fosfolipidoze. Fosfolipidoza je stanje, pri katerem pride do zmanjšane stopnje razgrajevanja fosfolipidov v lizosomih ter do njihovega kopičenja v lamelarnih telescih. Ta motnja običajno nastane ob vnosu amfifilnih, pozitivno nabitih snovi v celico. Med drugim je povečana tvorba lamelarnih telesc tudi stranski učinek pri uporabi t.i. amfifilnih kationskih zdravil (Anderson in Borlak, 2006). Novejše raziskave so pokazale, da pride tudi ob stiku celice z nekaterimi nanomateriali do povečane tvorbe lamelarnih telesc (Ma in sod., 2012; Wang in Petersen, 2013).

Pri svojem delu smo nameravali prilagoditi metodo za ugotavljanje prisotnosti lamelarnih telesc v človeških pljučnih celicah A549 s pomočjo fluorescentnih barvil, ki so namenjena za uporabo pri opredelitvi pojava fosfolipidoze. S prilagojeno metodo smo testirali vpliv nanodelcev silicijevega dioksida (nano-SiO₂) in bakrovega oksida (nano-CuO) na povečanje tvorbe lamelarnih telesc v človeških pljučnih celicah A549. Hkrati smo preverili tudi citotoksični vpliv obojih nanodelcev na celice A549.

Pri izdelavi naloge smo gojili človeške pljučne celice A549, uporabili smo metode za testiranje citotoksičnosti, ki nam dajo informacijo o stanju metabolizma v celicah (test MTT in test privzema barvila nevtralnno rdeče). Za opredelitev količine fosfolipidov v celicah smo uporabili tudi fluorescentno barvanje z uporabo na fosfolipide vezanega fluorescentnega barvila LipidTOX (Invitrogen). Intenzivnost fluorescence celic smo merili s pomočjo pretočne citometrije in fluorescenčne mikroskopije. Pri pripravi vzorcev za meritve fluorescence celic s pomočjo pretočne citometrije smo celice A549 izpostavili nanodelcem v različnih koncentracijah za 12 ur, 24 ur in 48 ur. Nano-CuO v nižjih koncentracijah smo celice A549 izpostavili tudi 72 ur in 7 dni. Pri pripravi vzorcev za pregled z epifluorescenčnim mikroskopom smo celice A549 izpostavili nanodelcem v različnih koncentracijah za 48 ur.

Rezultati so pokazali, da so nano-CuO bolj citotoksični oziroma bolj zmanjšajo metabolizem celic A549 kot nano-SiO₂. Učinek na celice A549 se namreč pozna že pri tretiranju z nano-CuO v koncentraciji 1 µg/mL, pri uporabi nano-SiO₂ pa pri skoraj nobeni uporabljeni koncentraciji viabilnost celic ne pade pod 70 % glede na viabilnost kontrolnih

celic. Zato smo za ovrednotenje količine lamelarnih telesc uporabili koncentracije nano-CuO, ki so bile nižje od uporabljenih koncentracij nano-SiO₂.

V nalogi smo optimizirali metodo barvanja celic s fluorescentnim barvilom, vezanim na fosfolipide LipidTOX. Pri pregledu preparatov z epifluorescenčnim mikroskopom in z meritvami na pretočnem citometru smo namreč opazili zelo veliko razliko med intenzivnostjo fluorescence pri kontrolnih celicah in celicah, tretiranih s 30- μ M propranololom, ki so predstavljale pozitivno kontrolo. Pri celicah pozitivne kontrole je bila intenzivnost fluorescence veliko višja kot pri celicah negativne kontrole. Pomembno pa je, da pri uporabi metode fluorescentnega barvanja kombiniramo metode za vizualizacijo (mikroskopija) in metode za kvantifikacijo (pretočna citometrija), zato da se prepričamo, da pri kateri izmed metod ni prišlo do pozitivnega rezultata zaradi artefaktov.

Pri fluorescentnem barvanju celic, tretiranih z nano-CuO, smo opazili povečano intenzivnost fluorescence v primerjavi s kontrolnimi celicami. Povprečna intenzivnost fluorescence celic je rasla z višanjem koncentracije nano-CuO. To pomeni, da nano-CuO povzročajo povečano vsebnost fosfolipidov in s tem lamelarnih telesc v celicah A549. Hkrati smo opazili, da intenziteta fluorescence s časom izpostavitve celic nanodelcem raste do 48-urne izpostavitve, pri daljšem času izpostavitve pa se ne s preminja oziroma celo pada. To smo si razlagali s tem, da si celice verjetno s pomočjo obrambnih mehanizmov po daljšem času opomorejo.

Tudi za celice, tretirane z nano-SiO₂, smo na pretočnem citometru izmerili večjo intenzivnost fluorescence kot pri kontrolnih celicah, vendar smo z uporabo epifluorescenčnega mikroskopa opazili, da zaradi vezave z uporabljenim fluorescentnim barvilom fluorescirajo tudi sami nano-SiO₂. Zaradi te ugotovitve ne moremo potrditi, da nano-SiO₂ povzročijo povečano tvorbo lamelarnih telesc v celicah A549. Uporabljena metoda torej sama po sebi ni najprimernejša za vrednotenje količine fosfolipidnih struktur v celicah, tretiranih z nano-SiO₂.

Ker se uporabljeno barvilo LipidTOX veže na različne fosfolipide, ne moremo z gotovostjo trditi, da so povečane intenzivnosti fluorescence res znak povečane količine lamelarnih telesc. Zato bi bilo za potrditev rezultatov potrebno preparate pregledati še s transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) in primerjati količino lamelarnih telesc pri kontrolnih celicah in celicah, izpostavljenih obojim nanodelcem v različnih koncentracijah.

8 VIRI

- Ahamed M., Siddiqui M.A., Akhtar M.J., Ahmad I., Pant A.B., Alhadlaq H.A. 2010. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 396, 2: 578–583
- Anderson N., Borlak J. 2006. Drug induced phospholipidosis. *FEBS letters*, 580: 5533–5540
- Aschberger K., Johnston H.J., Stone, V., Aitken, R.J., Tran C.L., Hankin S.M., Peters S.A. K., Christensen F.M. 2010. Review of fullerene toxicity and exposure – Appraisal of a human health risk assessment, based on open literature. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 58, 3: 455–473
- Atienzar F., Gerets H., Dufrane S., Tilmant K., Cornet M., Dhallun S., Ruty B., Rose G., Canning M. 2006. Determination of phospholipidosis potential based on gene expression analysis in HepG2 cells. *Toxicological sciences*, 96: 101–114
- Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 4: MR17–MR71
- Chae Y.J., Pham C.H., Lee J., Bae E., Yi J., Gu M.B. 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology*, 94: 320–327
- Chen Z., Meng H., Xing G., Yuan H., Zhao F., Liu R., Chang X., Gao X., Wang T., Jia G., Ye C., Chai Z., Zhao Y. 2008. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: Nanotoxicity has susceptible population. *Environmental science and technology*, 42, 23: 8985–8992
- Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z., Shin D.M. 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research*, 14: 1310–1316
- Čemažar M., Serša G., Motaln H., Verbovšek U., Todorovič V., Turnšek Lah T. 2013. *Biologija raka. Navodila za vaje*. Ljubljana, Onkološki inštitut Ljubljana in Nacionalni inštitut za biologijo, Univerza v Ljubljani: 42 str.
- Dastjerdi R., Montazer M. 2010. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerphases*, 79: 5–18
- Denda M., Fuziwara S., Inoue K. 2003. Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis. *Journal of investigative dermatology*, 121: 362–367

- Deng X., Luan Q., Chen W., Wang Y., Wu M., Zhang H., Jiao Z. 2009. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology*, 20: 1–8
- Foster K.A., Oster C.G., Mayer M.M., Avery M.L., Audus K.L. 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243, 2: 359–366
- Halliwell W. H. 1997. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicologic pathology*, 25: 53–60
- Hay N., Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes and development*, 18: 1926–1945
- HCS LipidTOX Phospholipidosis detection reagents. 2006. Eugene, Molecular probes, Inc. tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp34350.pdf (30.mar. 2014). (Navodilo za uporabo)
- Hutchinson T.H., Mahshid Y., Jönsson R., Björklund C., Kenne K. 2008. Proteomic analysis of phospholipidosis in citalopram treated U937 cells—support for the cholesterol biosynthesis hypothesis. *Toxicology in vitro*, 22: 1198–1204
- Jang, H.D., Kim, S., Kim, S. 2001. Effect of particle size and phase composition of titanium dioxide nanoparticles on the photocatalytic properties. *Journal of nanoparticle research*, 3: 141–147.
- Kang S.J., Kim B.M., Lee Y.J., Hong S.H., Chung H.W. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38-caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 386: 682–687
- Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J., Möller L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology*, 21, 9: 1726–1732
- Laplante M., Sabatini D.M. 2009. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Current biology*, 19: R1046–R1052
- Lin W., Huang Y., Zhou X, Ma Y. 2006. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 217: 252–259
- Lowe R., Mussa H.Y., Nigsch F., Glen R.C., Mitchell J. B. 2012. Predicting the mechanism of phospholipidosis. *Journal of cheminformatics*, 4: 2
- Lüllman H., Lüllman-Rauch R., Wassermann O. 1978. Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs. *Biochemistry and pharmacology*, 27: 1103–1108

- Ma J.Y., Zhao H., Mercer R.R., Barger M., Rao M., Meighan T., Schwegler-Berry D., Castranova V., Ma J.K. 2011. Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. *Nanotoxicology*, 5: 312–325
- Ma H., Williams P.L., Diamond S.A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environmental pollution*, 172: 76–85
- Ma J.Y., Mercer R.R., Barger M., Schwegler-Berry D., Scabilioni J., Ma J.K., Castranova V. 2012. Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology*, 262: 225–264
- Mason, R.J., Crystal, R.G. 1998. Pulmonary cell biology. *American journal of respiratory critical care medicine*, 157: S72–S81
- Mesens N., Steemans M., Hansen E., Peters A., Verheyen G., Vanparys P. 2009. A 96-well flow cytometric screening assay for detecting *in vitro* phospholipidosis induction in the drug discovery phase. *Toxicology in vitro*, 23: 217–226
- Mingeot-Leclercq M.P., Laurent G., Tulkens P.M. 1988. Biochemical mechanism of aminoglycoside-induced inhibition of phosphatidylcholine hydrolysis by lysosomal phospholipases. *Biochemical pharmacology*, 37: 591–599
- Monteith D.K., Morgan R.E., Halstead B. 2006. *In vitro* assays and biomarkers for drug-induced phospholipidosis. *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*, 2: 687–696
- Mukherjee S.P., Byrne H.J. 2013. Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: experimental observation and numerical simulation. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 9: 201–211
- Nardone L.L., Andrews S.B. 1979. Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors. *Biochimica et biophysica acta*, 573, 2: 276–295
- Nioi P., Perry B.K., Wang E., Gu Y., Snyder R.D. 2007. *In vitro* detection of drug-induced phospholipidosis using gene expression and fluorescent phospholipid-based methodologies. *Toxicological sciences*, 99: 162–173
- Nowak J.S., Mehn D., Nativo P., Garcia C.P., Gioria S., Ojea-Jimenez I., Gilliland D., Rossi F. 2014. Silica nanoparticle uptake induces survival mechanism in A549 cells by the activation of autophagy but not apoptosis. *Toxicology letters*, 224, 1: 84–92

- Park S., Choi Y.J., Lee B.H. 2012. In vitro validation of drug-induced phospholipidosis. *Journal of toxicological sciences*, 37: 261–267
- Peterson T.R., Sengupta S.S., Harris T.E., Carmack A.E., Kang S.A., Balderas E., Guertin D.A., Madden K.L., Carpenter A.E., Finck B.N., Sabatini D.M. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146: 408–420
- Propranolol. National center for biotechnology information. PubChem compound database. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/rest/chemical/d-propranolol#> (21. jul. 2014)
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G. 2012. Rang and Dale's pharmacology. 7th ed. London, Churchill Livingstone Elsevier, 777 str.
- Reasor M.J. 1989. A review of the biology and toxicologic implications of the induction of lysosomal lamellar bodies by drugs. *Toxicology and applicative pharmacology*, 97: 47–56
- Reasor M.J., Kacew S. 2001. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences?. *Experimental biology and medicine*, 226: 825–830
- Repetto G., del Peso A., Zurita J.L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3, 7: 1125–1131
- Roszell B.R., Tao J.Q., Yu K.J., Huang S., Bates S.R. 2012. Characterization of the Niemann-Pick C pathway in alveolar type II cells and lamellar bodies of the lung. *American journal of physiology: lung cellular and molecular physiology*, 302: 919–932
- Roy S., Sharma S., Sharma M., Bose M. 2014. Differential signaling of inducible nitric oxide synthase induction in *Mycobacterium tuberculosis* infected alveolar epithelial cell line A549 in response to cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-1 β . *International journal of mycobacteriology*, 3, 1: 17–24
- Sawada H., Takami K., Asahi S. 2005. Toxicogenomic approach to drug induced phospholipidosis analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system. *Toxicological sciences*, 83: 282–292
- Schins R.P.F., Knaapen A. M. 2007 Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation toxicology*, 19: 189–198
- Schleh C., Muhlfeld C., Pulskamp K., Schmiedl A., Nassimi M., Lauenstein H.D., Braun A., Krug N., Erpenbeck V., Hohlfeld J.M. 2009. The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonarx surfactant function and ultrastructure. *Respiratory research*, 10: 90

- Schmitz G. in Müller G. 1991. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of lipid research*, 32: 1539–1570
- Shahane S.A., Huang R., Gerhold D., Baxa U., Austin C.P., Xia M. 2014. Detection of phospholipidosis induction: a cell based assay in high-throughput and high-content format. *Journal of biomolecular screening*, 19: 66–76
- Shapero K., Fenaroli F., Lynch I., Cottell D.C., Salvati A., Dawson K. A. 2011. Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells. *Molecular biosystems*, 7: 371–378
- Siddiqui M.A., Alhadlaq H.A., Ahmad J., Al-Khedhairi A., Musarrat J., Ahamed M. 2013. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *PlosOne*, 8, 8: e69534
- Simon-Deckers A., Gouget B., Mayne-L'Hermite M., Herlin-Boime N., Reynaud C., Carriere M. 2008. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, 253: 137–146
- Singh S., Shi T., Duffin R., Albrecht A., van Berlo D., Höhr D., Fubini B., Martra G., Fenoglio I., Borm P.J.A., Schins R.P.F. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and applied pharmacology*, 222, 2: 141 – 151
- Stearns R.C., Paulauskis J.D., Godleski J.J. 2011. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *American journal of respiratory cell molecular biology*, 24: 108–115
- Stern S.T., Adiseshaiah P.P., Crist R.M. 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and fibre toxicology*, 9: 20–35
- Taylor D.A. 2002. Dust in the wind. *Environmental health perspectives*, 110: A80–A87
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L., Von Mikecz A., Grether-Beck S., Schins R.P.F. 2007. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1, 1: 52–71
- Van Lenten B.J., Wagner A.C., Navab M., Anantharamaiah G.M., Ka-Wai Hui E., Nayak D.P., Fogelman A.M. 2004. D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic peptide, inhibits the inflammatory response induced by influenza A infection of human type II pneumocytes. *Circulation*, 110: 3252–3258

Wang B., Chen N., Wei Y., Li J., Sun L., Wu J., Huang Q., Liu C., Fan C., Song H. 2012. Akt signaling-associated metabolic effects of dietary gold nanoparticles in *Drosophila*. *Scientific reports*, 2: 563

Wang M., Petersen N.O. 2013. Lipid-coated nanoparticles promote lamellar body formation in A549 cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1831: 1089–1097

Yang X., Liu J., Zhou L., Gong C., Wang X., Yang L., Yuan J., Huang H., He L., Zhang B., Zhuang Z. 2010. SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Particle and fibre toxicology*, 7: 1–1

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Damjani Drobne in Venu Kononenku za pomoč in usmerjanje pri delu.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič za natančno prebrano nalogo ter popravke in komentarje.

Barbari Drašler in Tei Romih se zahvaljujem za pomoč pri karakterizaciji nanodelcev.

Zahvaljujem se tudi osebju na Katedri za splošno zoologijo in osebju laboratorija za klinično biofiziko, ki so omogočili izvedbo praktičnega dela magistrske naloge.

Zahvaljujem se še babici za vse popravke in pripombe ter stari mami za lektoriranje naloge.

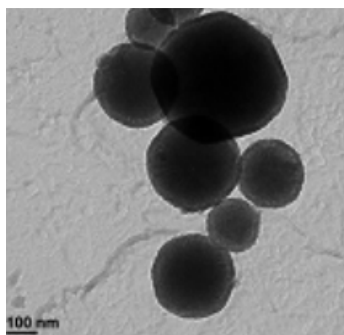
Za podporo se zahvaljujem tudi svoji družini in Marku.

PRILOGA A

KLASIFIKACIJA NANODELCEV, UPORABLJENIH V NALOGI

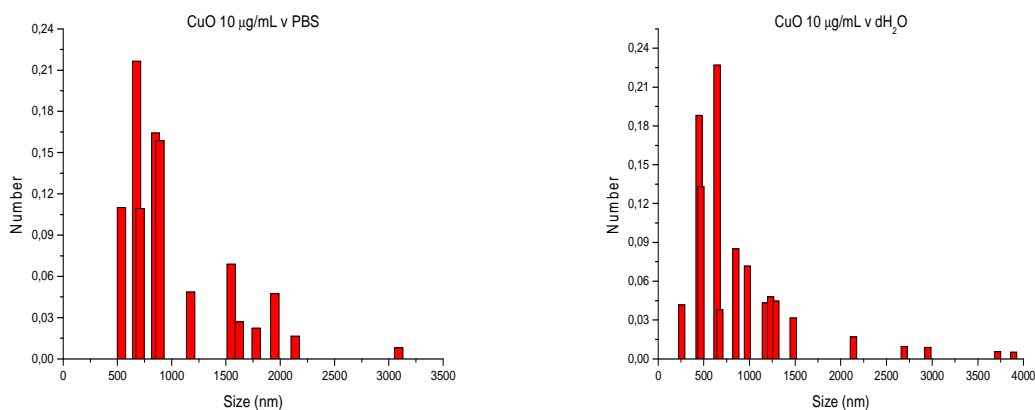
Klasifikacijo v nalogi uporabljenih nanodelcev so opravili sodelavci iz evropskega projekta NanoValid. Meritve zeta potenciala nano-CuO in nano-SiO₂ v različnih medijih sta opravila Peter Dušak in Darko Makovec z Instituta Jožef Stefan. Meritve DLS (s pomočjo katerih določimo velikost nanodelcev) za nano-SiO₂ je opravil Roberto Hanoi Labrador iz NLAB (Nanologica AB), za nano-CuO pa sta jih opravila Peter Dušak in Darko Makovec z Instituta Jožef Stefan (sl. A2).

Na sliki A1 je prikazan posnetek nano-SiO₂ s TEM, ki ga je pripravil Superb Misra z Birminghamske univerze.



Slika A1: Posnetek nano-SiO₂ s TEM

Na sliki A2 je prikazana velikostna porazdelitev nano-CuO v koncentraciji 10 µg/mL v pufri PBS in v destilirani vodi, izmerjena s pomočjo DLS.



Slika A2: Velikostna porazdelitev nano-CuO v koncentraciji 10 µg/mL v pufri PBS (levo) in v destilirani vodi (desno). Meritve sta opravila Peter Dušak in Darko Makovec iz Instituta Jožef Stefan.

PRILOGA B

ODTAPLJANJE BAKROVIH IONOV Z NANODELCEV BAKROVEGA OKSIDA

V preglednici B1 so prikazani rezultati meritev atomske absorpcijske spektroskopije (AAS), ki predstavljajo količino odtapljanja ionov bakra z nano-CuO v različnih medijih. Opazimo lahko, da so koncentracije bakra v celičnem mediju višje od koncentracij bakra v destilirani vodi ter, da so pri nano-CuO v višjih koncentracijah tudi koncentracije bakra višje.

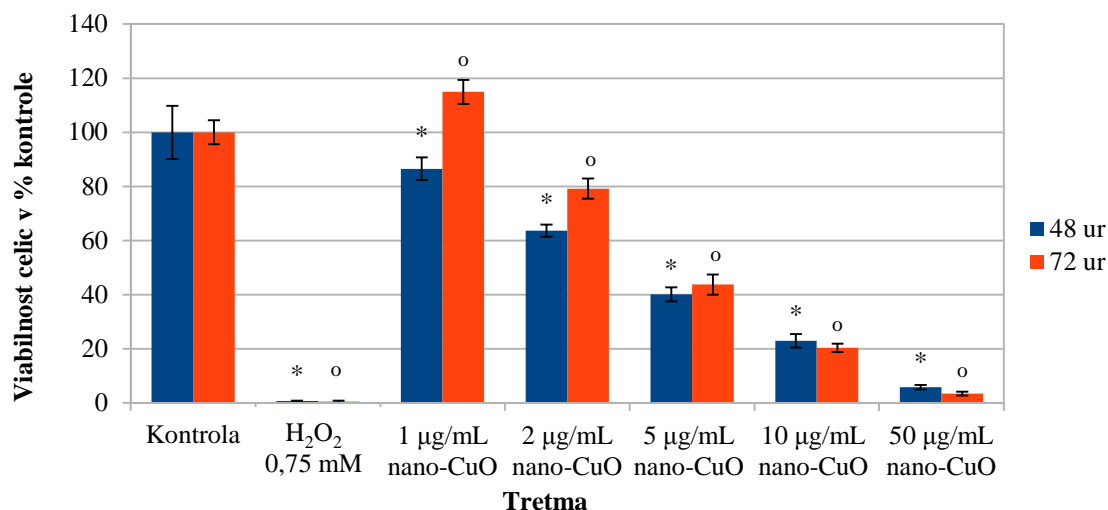
Preglednica B1: Povprečne koncentracije bakra (Cu) s standardno deviacijo pri nanodelcih bakrovega oksida (nano-CuO) v različnih koncentracijah v celičnem mediju in v destilirani vodi. Meritve je s pomočjo atomske absorpcijske spektroskopije opravila Tea Romih z Biotehniške fakultete.

Vzorec	Koncentracija Cu [mg/L]			
	nano-CuO v celičnem mediju		nano-CuO v destilirani vodi	
	Po razklopu	Po razklopu	Izvorni supernatant	Izvorni supernatant + HNO ₃
nano-CuO 1 µg/mL	0,406 ± 0,017	0,170 ± 0,005	0,099 ± 0,004	0,122 ± 0
nano-CuO 2 µg/mL	0,816 ± 0,073	0,307 ± 0,023	0,112 ± 0,01	0,121 ± 0,016
nano-CuO 5 µg/mL	2,167 ± 0,067	0,304 ± 0,007	0,138 ± 0,007	0,147 ± 0,033
nano-CuO 10 µg/mL	5,984 ± 0,24	0,348 ± 0,011	0,200 ± 0,016	0,248 ± 0,021

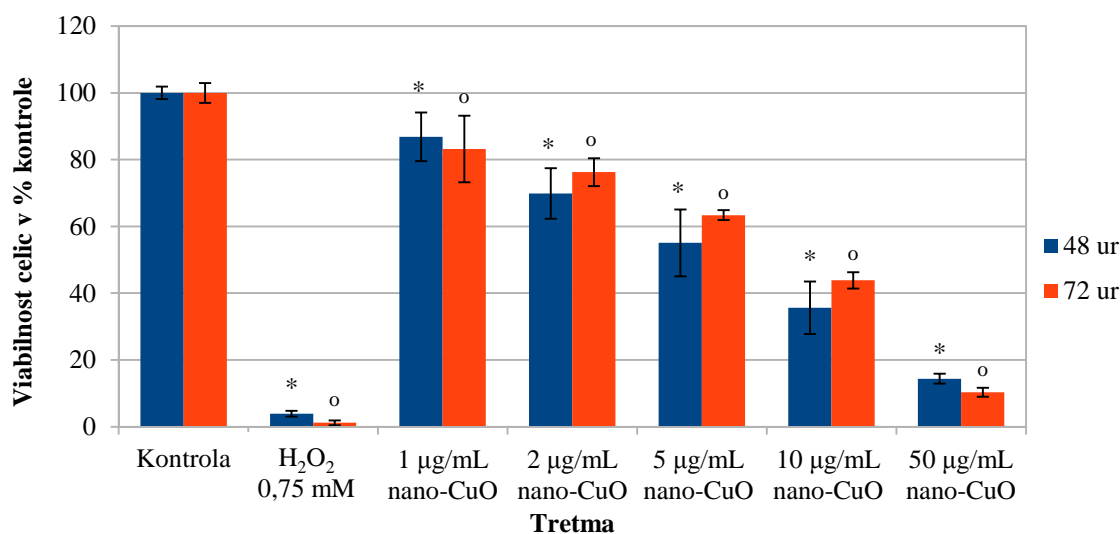
PRILOGA C

CITOTOKSIČNOST PRI 48- IN 72-URNEM TRETIRANJU CELIC A549 Z NANODELCI

Na slikah C1, C2, C3 in C4 so prikazani rezultati testa MTT in testa privzema barvila NR pri 48- in 72-urnem tretiranju celic A549 z nano-CuO in nano-SiO₂. Meritve je opravil Venko Kononenko na Biotehniški fakulteti.

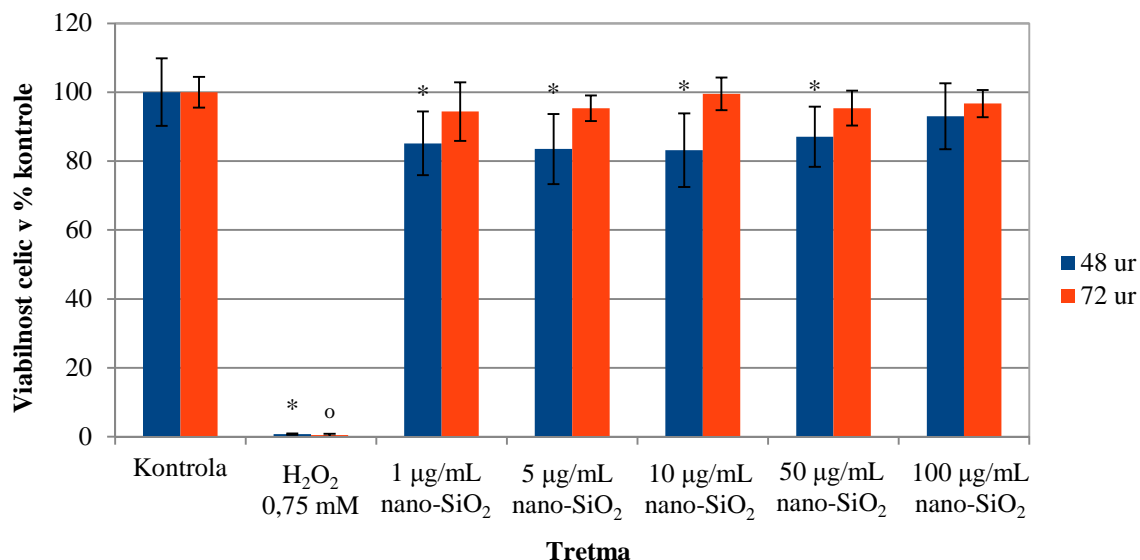


Slika C1: Rezultati testa MTT – povprečna viabilnost celic v odstotkih viabilnost celic kontrole (kontrola je 100 %) pri tretiranju z nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75 mM H₂O₂) kontroli. Celice so bile tretmajem izpostavljene 48 in 72 ur. Viabilnost celic, izpostavljenih enako časa nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma 0,75 mM H₂O₂, je primerjana z intenzivnostjo fluorescence celic, ustrezno časovno izpostavljenih samo mediju (kontrola). $\bar{x} \pm SD$, n = 6; **p* < 0,05 za 48 ur izpostavljene celice, ^o*p* < 0,05 za 72 ur izpostavljene celice.

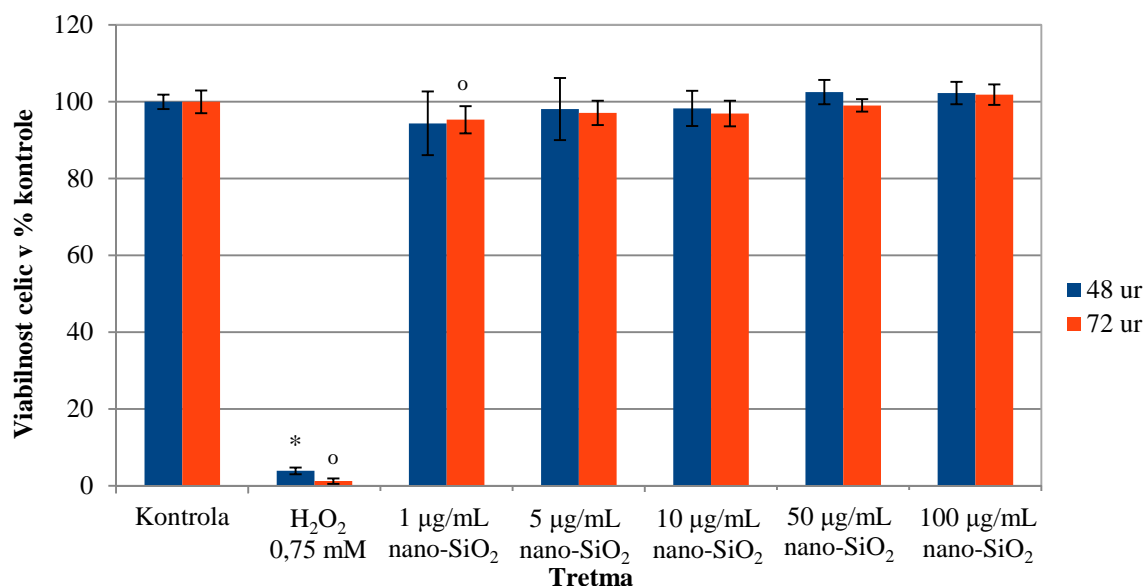


Slika C2: Rezultati testa privzema barvila NR – povprečna viabilnost celic v odstotkih viabilnost celic kontrole (kontrola je 100 %) pri tretiranju z nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75 mM H₂O₂) kontroli. Celice so bile tretmajem izpostavljene 48 in 72 ur.

Viabilnost celic, izpostavljenih enako časa nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma 0,75 mM H₂O₂, je primerjana z intenzivnostjo fluorescence celic, ustrezno časovno izpostavljenih samo mediju (kontrola). $\bar{x} \pm SD$, n = 6; * $p < 0,05$ za 48 ur izpostavljene celice, ° $p < 0,05$ za 72 ur izpostavljene celice.



Slika C3: Rezultati testa MTT – povprečna viabilnost celic v odstotkih viabilnost celic kontrole (kontrola je 100 %) pri tretiranju z nano-SiO₂ v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75 mM H₂O₂) kontroli. Celice so bile tretmajem izpostavljene 48 in 72 ur. Viabilnost celic, izpostavljenih enako časa nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma 0,75 mM H₂O₂, je primerjana z intenzivnostjo fluorescence celic, ustrezno časovno izpostavljenih samo mediju (kontrola). $\bar{x} \pm SD$, n = 6; * $p < 0,05$ za 48 ur izpostavljene celice, ° $p < 0,05$ za 72 ur izpostavljene celice.



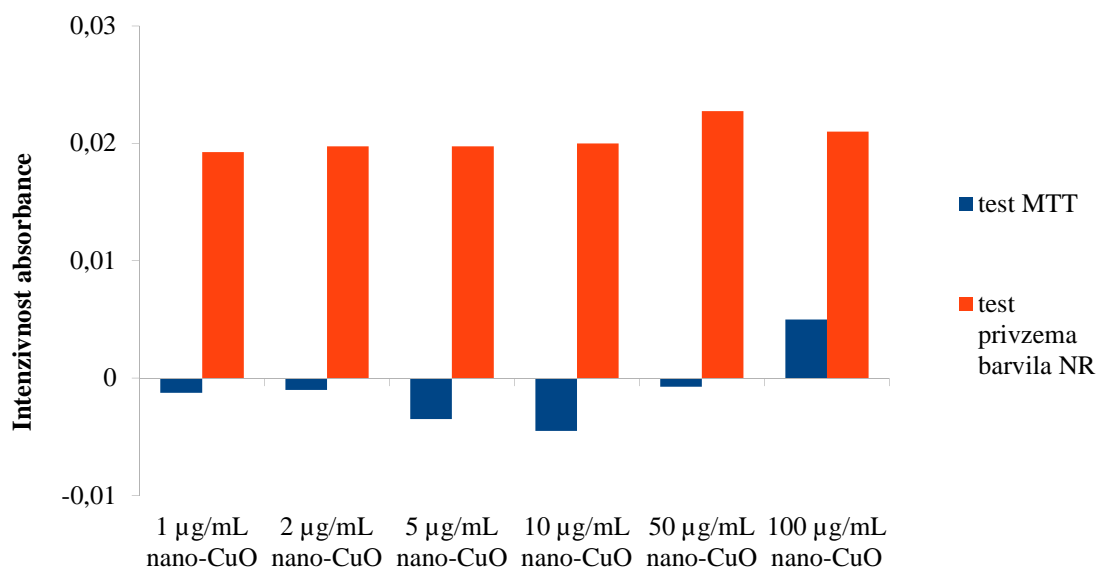
Slika C4: Rezultati testa privzema barvila NR – povprečna viabilnost celic v odstotkih viabilnost celic kontrole (kontrola je 100 %) pri tretiranju z nano-SiO₂ v različnih koncentracijah oziroma pri negativni (kontrola) in pozitivni (0,75 mM H₂O₂) kontroli. Celice so bile tretmajem izpostavljene 48 in 72 ur. Viabilnost celic, izpostavljenih enako časa nano-CuO v različnih koncentracijah oziroma 0,75 mM H₂O₂, je primerjana z intenzivnostjo fluorescence celic, ustrezno časovno izpostavljenih samo mediju (kontrola). $\bar{x} \pm SD$, n = 6; * $p < 0,05$ za 48 ur izpostavljene celice, ° $p < 0,05$ za 72 ur izpostavljene celice.

PRILOGA D

VPLIV SUSPENZIJ NANODELCEV NA MERITVE ABSORBANCE

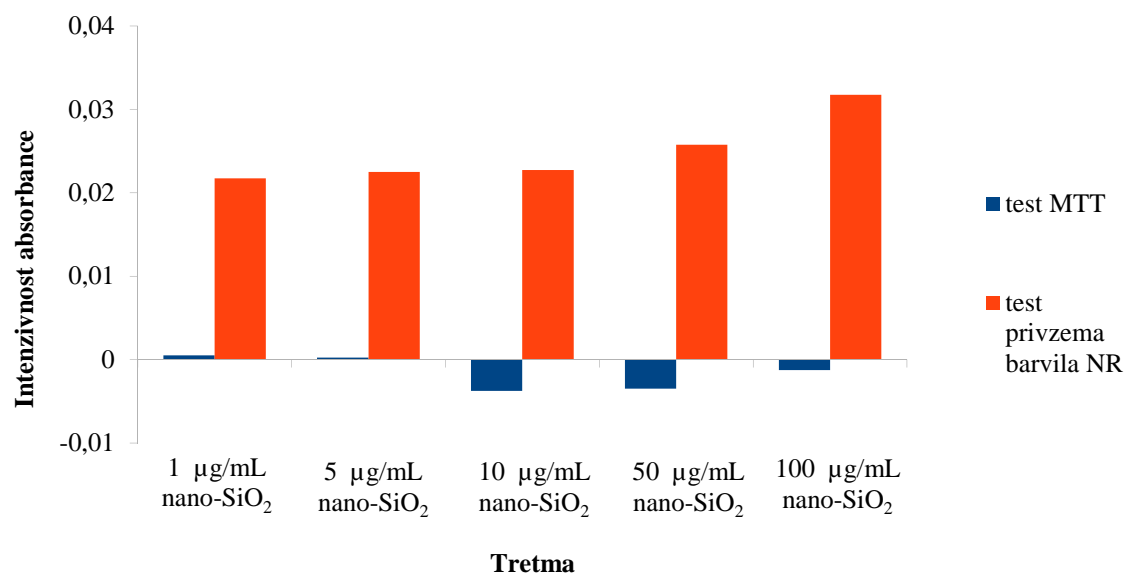
Na slikah D1 in D2 je prikazana intenzivnost absorbance suspenzij nano-CuO in nano-SiO₂, v različnih koncentracijah v celičnem mediju brez celic. Ti vzorci so bili pripravljene hkrati z vzorci, za izvedbo testa MTT in testa privzema barvila NR. Pripravljene so bili po enakem postopku kot vzorci s celicami (postopek, je podrobneje opisan v poglavju 3.3 oziroma 3.4).

Opazimo lahko, da pri obeh vrstah nanodelcev le-ti z barvilom MTT interferirajo malo oziroma skoraj nič, bolj pa oboji nanodelci interferirajo z barvilom NR. Za primerjavo omenimo, da so povprečne vrednosti absorbance kontrolnih celic pri rezultatih testa MTT okoli 0,9, pri rezultatih testa privzema barvila NR pa okoli 0,1.



Tretma

Slika D1: Intenziteta absorbance suspenzij brez celic nano-CuO v različnih koncentracijah v celičnem mediju. Vzorci so bili obarvani z barvilom MTT oziroma NR.



Slika D2: Intenziteta absorbance suspenzij brez celic nano-SiO₂ v vrazličnih koncentracijah v celičnem mediju. Vzorci so bili obarvani z barvilom MTT oziroma NR.